



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Nanoterapias frente a microorganismos intracelulares. Desde la Leishmaniasis a la Listeriosis

Nanotherapies Against Intracellular Microorganisms. From Leishmaniasis to Listeriosis.

Autora: Luz María Díaz Palma

Directora: Dña. Mónica López Fanarraga

Co-directora: Dña. Lourdes Valdivia Fernández

Santander, junio 2020

Contenido

Resumen.....	4
Abstract	4
Introducción y antecedentes	5
Leishmaniasis	7
Epidemiología.....	8
Ciclo biológico y transmisión.....	8
Cuadros clínicos.....	11
Leishmaniasis cutánea.....	11
Leishmaniasis cutánea diseminada	12
Leishmaniasis muco-cutánea	12
Leishmaniasis visceral o kala-azar	13
Post kala-azar	14
Coinfección leishmaniasis-VIH	14
Diagnóstico.....	15
Prevención.....	15
Tratamiento de la leishmaniasis	16
Antimoniales pentavalentes.....	16
Tratamientos de segunda línea	18
Anfotericina B.....	18
Miltefosina	19
Paromomicina	20
Pentamidina	21
Vacunación.....	22
Listeriosis	23
Epidemiología.....	23
Patogénesis	24

Clínica	26
Listeriosis no invasiva	26
Listeriosis invasiva	26
Diagnóstico.....	27
Prevención.....	27
Tratamiento de la listeriosis.....	28
Generalidades	28
Plan de tratamiento	28
Nuevas perspectivas en el tratamiento de enfermedades intracelulares.....	30
Nanotransportadores.....	31
Liposomas.....	34
Nanopartículas poliméricas.....	37
Quantum dots	38
Nanopartículas sólidas lipídicas	39
Dendrimeros.....	40
Nanopartículas de sílice mesoporosa.....	40
Nanopartículas metálicas	41
Discusión y conclusiones	42
Bibliografía	44
Agradecimientos	50

Resumen

A pesar de que en la actualidad existe un amplio arsenal de agentes terapéuticos, para tratar infecciones producidas por microorganismos intracelulares, en muchas ocasiones estos tratamientos no son seguros ni efectivos. Dos ejemplos de estas patologías son las producidas por el parásito *Leishmania spp.* y la bacteria *Listeria spp.* que son capaces de escapar del sistema inmune del individuo infectado, entrando y replicándose dentro de las células de dicho sistema, dificultando en gran medida su erradicación y cronificándose en el tiempo. A estos problemas hay que añadir la aparición de resistencias a los tratamientos convencionales, hecho que ha obligado a buscar nuevas estrategias y soluciones frente al tratamiento de estas patologías. Una posible alternativa está en el desarrollo y empleo de la nanotecnología, ya que ofrece una gran variedad de sistemas de vehiculización a escala nanométrica que permiten transportar dichos fármacos específicamente limitando los efectos adversos y potenciando su efectividad.

Palabras clave: Nanomedicina, nanotransportadores, leishmania, listeria.

Abstract

Even though there is a wide range of therapeutic agents, it is frequently seen that these treatments for intracellular microorganisms are not that safe or effective. Two examples of these pathologies are those caused by the parasite *Leishmania spp.* and the bacterium *Listeria spp.* both able to escape from the immune system of an infected patient, entering and replicating within the macrophages, resulting their elimination very difficult and becoming chronic over time. Besides these problems, the increasing resistance to conventional treatments has forced us to seek new strategies and solutions to treat these pathologies. A possible alternative is in the development and use of nanotechnology, since it offers a great variety of vehicle systems on a nanometric scale that allows to transport these drugs specifically, limiting adverse effects and enhancing their efficiency.

Keywords: Nanomedicine, nanocarriers, leishmania, listeria.

Introducción y antecedentes

Desde que, en 1928, Fleming descubriese el primer antibiótico, la Penicilina G o Bencilpenicilina, se han ido descubriendo más moléculas, entre los que se encuentran la estreptomicina (1943), las cefalosporinas (1945), la vancomicina (1956), la ampicilina (1961), así como las fluoroquinolonas (1978). Sin embargo, en los últimos años el ritmo de producción se ha visto disminuido principalmente porque la inversión que se ha de realizar en este tipo de fármacos para su posterior puesta en el mercado es más que considerable. Hoy, casi un siglo después de la aparición del primer antibiótico, muchos antimicrobianos se han vuelto incapaces de cumplir su función, apareciendo bacterias que son cada vez más resistentes a ellos e incluso algunas hasta se han vuelto multirresistentes hasta el punto de ser invencibles (1).

Esta situación se vuelve más compleja si se considera que desde finales de la década de los 80 prácticamente no se han descubierto nuevos antibióticos. En los últimos años, son muchas las declaraciones e informes que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha enviado a la industria farmacéutica mundial indicando que los esfuerzos por descubrir nuevos antibióticos son insuficientes para enfrentarnos al desafío de la resistencia a los antimicrobianos. Hay poco interés por parte de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos antibióticos ya que se tratan de medicamentos con los que su uso es siempre temporal. Esto significa que no se puede vincular el desarrollo de nuevos antibióticos al modelo económico habitual al que está acostumbrada la industria, con pacientes crónicos, por ejemplo, en los que el uso del fármaco es más prolongado y los beneficios pueden ser mayores. El antibiótico es un tipo de medicamento que hay que utilizar lo menos posible, solo en casos necesarios, así que es necesario buscar incentivos distintos de la venta del fármaco para estimular el desarrollo de antibióticos nuevos. Además, los antimicrobianos no sólo son complejos de desarrollar, los nuevos productos no pueden ser vendidos con libertad. Las posibles nuevas moléculas que pueden surgir en el mercado deben colocarse en reserva para los casos más graves, por lo que esto no presenta una oportunidad de inversión atractiva (2).

En los últimos años, tal y como señala un informe de la OMS, emitido en septiembre de 2017 solo se han aprobado ocho nuevos agentes antibacterianos pero, según apunta dicho informe, estos presentan beneficios clínicos limitados. Tan solo destacan el lanzamiento de Pretomanid, para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente, desarrollado por la organización sin ánimo de lucro TB Alliance. De los cincuenta antibióticos que se encuentran actualmente en investigación, solo treinta y dos se dirigen a patógenos marcados por la OMS como patógenos de gran prioridad global. No obstante, de estos, apunta el documento, la mayoría solo tienen beneficios limitados si se les compara con los antimicrobianos ya existentes. En cuanto a los avances en nuevas moléculas, existen doscientos cincuenta y dos agentes en investigación básica, pero estas nuevas moléculas aún no se han sometido a pruebas de seguridad o eficacia y tardarán, según la entidad, al menos diez años en llegar al mercado, si demuestran ser viables (3).

El problema de las resistencias no solo afecta a los antibióticos, otro grupo de fármacos como los antiparasitarios presentan muchos inconvenientes que

comprometen la salud del paciente, por su toxicidad sumado a una falta de efectividad terapéutica. Los primeros logros para el tratamiento con antiparasitarios se consiguieron en los años 30. Sin embargo, la industria farmacéutica fue disminuyendo su actividad debido a la falta de incentivos para el desarrollo de nuevos antiparasitarios. Este estancamiento y el empleo de antiparasitarios que llevan más de 40 años en el mercado ha fomentado la generación de resistencias. Teniendo en cuenta estas dificultades y la falta de vacunas frente a estos microorganismos, los esfuerzos se han centrado en tomar medidas para el control medioambiental y sólo emplear fármacos antiparasitarios en el momento en el que se adquiere la enfermedad. Considerando esto, el estudio del ciclo biológico y del comportamiento del parásito dentro del organismo permite conocer mejor su fisiología y puede dar indicios de cómo diseñar nuevos compuestos centrándonos en sus dianas específicas consiguiendo que los fármacos lleguen allí en concentraciones eficaces sin producir gran toxicidad como lo hacen los tratamientos del mercado (4).

En el trabajo que a continuación se va a desarrollar, se han elegido dos ejemplos de patógenos, la *Leishmania spp.* y la *Listeria spp.*, causantes de dos de las enfermedades (Leishmaniosis y Listeriosis) que se encuentran en la actualidad afectadas por esta falta de efectividad en su tratamiento, así como por el problema en la aparición de resistencias. Ambos comparten la peculiaridad de ser microorganismos intracelulares, es decir, infectan a una célula huésped y consiguen vivir y replicarse dentro de ella, aunque ambos patógenos tienen diferentes características ya que *Leishmania spp.* es un protozoo mientras que *Listeria spp.* es una bacteria.

Por un lado, la leishmaniasis se define como una enfermedad tropical endémica en 98 países, incluido España, con datos epidemiológicos tales como 700.000 – 1 millón de nuevos casos anuales y entre 26.000 y 65.000 defunciones según la OMS. Problemas que surgen en el tratamiento de la leishmaniasis son su alto coste, la duración de este, la gran toxicidad que tiene y las resistencias asociadas(5,6). Existen regiones como la de Bihar en India en las que la refractariedad al tratamiento convencional con antimoniales pentavalentes llega al 60% con lo cual se crea una necesidad de encontrar nuevas formulaciones para tratar a los afectados (7).

Por otro lado, la listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria que desde 2015 se encuentra entre las enfermedades de declaración obligatoria (EDO). La mayoría de los casos se deben a casos esporádicos, pero su importancia radica en la posibilidad de producir brotes epidémicos debido a la ingesta de alimentos contaminados por un mal control en la producción alimentaria. Durante el periodo 2013-2017, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) informó que España se situaba en el tercer lugar con más casos de listeriosis con un 10%, detrás de Alemania y Francia con un 26% y 17% respectivamente. A pesar de ello, la mayoría de los casos (98%) son de origen doméstico (8). Generalmente, produce cuadros leves de gastroenteritis, pero en algunos casos y, sobre todo en grupos de riesgo (mayores de 65 años, pacientes inmunodebilitados, mujeres embarazadas y recién nacidos), la infección puede diseminarse y cronificarse. El tratamiento empírico de la listeriosis debe instaurarse rápidamente mediante la administración de ampicilina y gentamicina y pautarse durante unas 2 semanas. A pesar de ello, la mortalidad en los casos diseminados alcanza el 30% (9). Se destaca esta enfermedad por la gran

repercusión que tuvo el brote que hubo en Andalucía el pasado verano – entre el 7 de julio y el 13 de septiembre – asociado a la producción de carne mechada contaminada en dicha Comunidad Autónoma. En España, se notificaron 222 casos confirmados vinculados a dicho brote, 6 mujeres que sufrieron abortos y 3 muertes en mayores de 65 años (10).

El motivo para centrar el trabajo en ambas enfermedades es la necesidad de proponer nuevos tratamientos para salvaguardar gran parte de los problemas que pueden surgir en el tratamiento de estas enfermedades intracelulares como son la falta de eficacia terapéutica o la aparición de resistencias. Como posible solución a estos problemas, en este trabajo se propone el empleo de la nanotecnología aplicada a la medicina como alternativa al tratamiento de estas enfermedades. En los últimos años, se ha desarrollado rápidamente el campo de la nanotecnología con aplicación médica, surgiendo así la Nanomedicina, una disciplina con gran potencial de cara a la aplicación clínica que permite tanto tratar como prevenir enfermedades.

Uno de los objetivos de la nanomedicina es el diseño y estudio en el transporte de fármacos permitiendo vehiculizar el tratamiento, mejorando la interacción de los fármacos con la diana farmacológica de forma específica, lo que permite el empleo de una menor dosis de tratamiento, y en consecuencia disminuir la toxicidad en el paciente.

Leishmaniasis

La leishmaniasis se define como una enfermedad infecciosa producida por protozoos flagelados del género *Leishmania spp.* Dicho género tiene una gran variedad de especies como se ve reflejado en la tabla 1. Se trata de una enfermedad endémica que afecta en gran parte a países del tercer mundo. Principalmente, da lugar a tres cuadros clínicos bien diferenciados como son la leishmaniasis cutánea, muco-cutánea y visceral o kala-azar) que se explicarán posteriormente.

Tabla 1. Principales vectores de las especies de *Leishmania spp.* más importantes y su distribución geográfica (11)

ESPECIES	VECTOR	DISTRIBUCIÓN
Viejo Mundo		
<i>L. donovani</i>	<i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i>	Asia
<i>L. infantum</i>	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i>	África
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i>	Mediterráneo, África y Asia
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	Mediterráneo y Asia
<i>L. aethiopica</i>	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Etiopía y Kenia
Nuevo Mundo		
<i>L. chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	Brasil, América del Sur, América Central
<i>L. mexicana</i>	<i>Lu. olmeca</i>	Yucatán y Guatemala
<i>L. braziliensis</i>	<i>Psy. wellcomi</i>	América del Sur y América Central
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i>	América del Sur

<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. peruensis</i>	Perú
	<i>Lu. verrucarum</i>	
<i>L. panamensis</i>	<i>Lu. trapidoi</i>	América Central y América del Sur
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. fasicutellata</i>	América del Sur

L.: Leishmania

P.: Phlebotomus

Lu.: Lutzomyia

Psy.: Phlebotomus

Epidemiología

La leishmaniasis es considerada una de las principales enfermedades tropicales. Se estima que mundialmente existen alrededor de 15 millones de personas infectadas y 350 millones de personas en riesgo de contraerla. Actualmente, la OMS estima que hay alrededor de un millón de casos nuevos cada año y, así mismo, se calcula que el número de defunciones es de unas 70.000 personas anualmente (12).

Para ilustrarlo mejor y conocer su extensión, se sabe que la distribución del género *Leishmania spp.* abarca al menos 98 países, principalmente de áreas tropicales y subtropicales. Como se ha comentado, es una infección endémica en África, América, Asia y en el área del Mediterráneo donde el clima húmedo y cálido de estas regiones propicia su supervivencia (7,13). Dentro del género *Leishmania spp.*, existen al menos 15 especies que afectan al hombre. Estas especies se pueden clasificar según su localización entre el Nuevo Mundo o América donde se incluyen 10 de estas especies y el Viejo Mundo del que forman parte Europa, África, Asia y Oceanía donde se localizan las cinco restantes. El principal vector de la leishmaniasis es el mosquito de los géneros *Phlebotomus spp.* y *Lutzomyia spp.*, que se localizan en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo, respectivamente. Ambos vectores, representados en la figura 1, se encuentran muy presentes en estas zonas ya que características como son un ambiente húmedo, rico en materia orgánica o unas temperaturas moderadamente altas ofrecen el medio ideal para su proliferación.



Phlebotomus argentipes



Lutzomyia longipalpis

Figura 1. Vectores que transmiten el parásito *Leishmania spp.*

Ciclo biológico y transmisión

La *Leishmania spp.* es un parásito intracelular obligado que se transmite e infecta a mamíferos y humanos mediante la picadura de los mosquitos de las familias *Phlebotomus spp.* y *Lutzomyia spp.* de forma zoonótica o antroponótica. La infección puede dar lugar a los siguientes tres cuadros diferenciados:

- Leishmaniasis cutánea (forma más común)
- Leishmaniasis muco-cutánea
- Leishmaniasis visceral o kala-azar (forma más grave de la enfermedad)

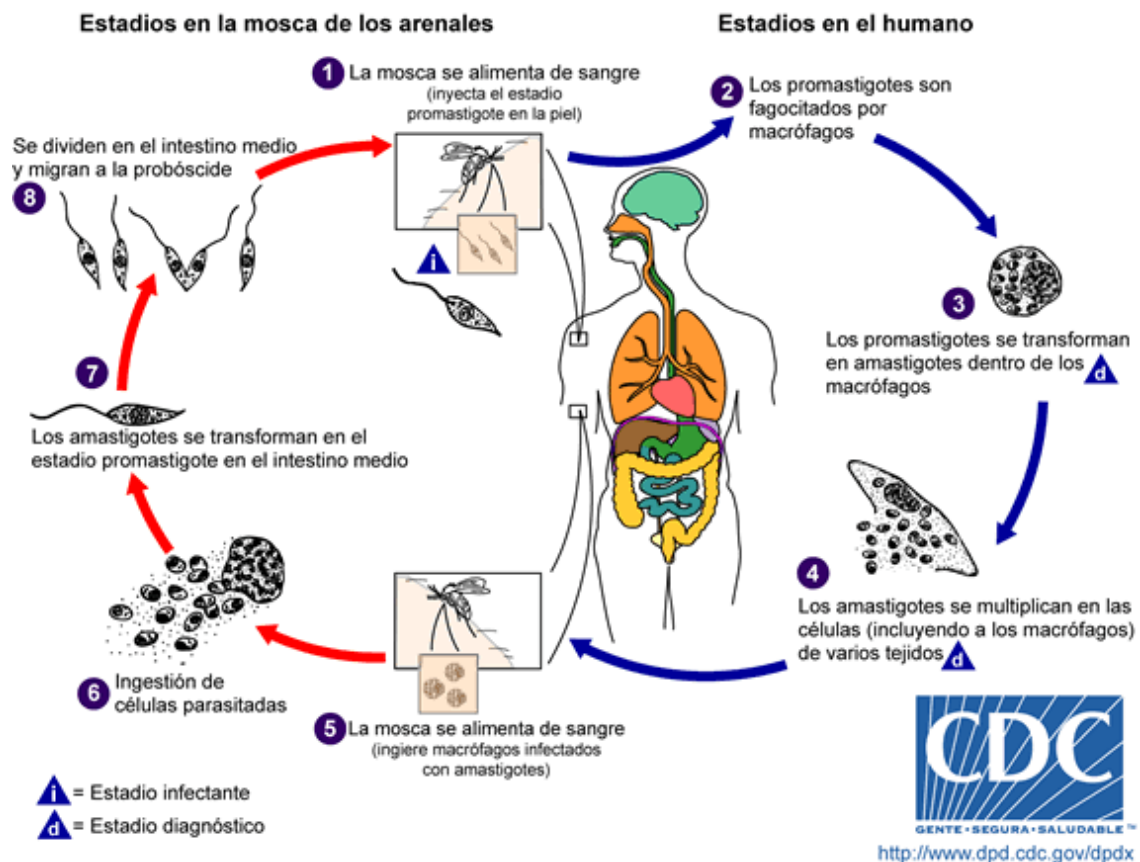


Figura 2. Ciclo biológico *Leishmania* spp. (14)

Por lo general, se habla de enfermedad zoonótica ya que la infección es incidental del mosquito al humano. No obstante, existen algunos casos puntuales como los de leishmaniasis visceral en la India en los que el ciclo de transmisión ha cambiado hablándose de antroponosis, es decir, la transmisión sigue la secuencia humano-vector-humano. Generalmente, en cada región existe una especie de *Leishmania* spp. que tiene un reservorio primario o huésped y una especie o subespecie de flebotomo vector.

Dentro del ciclo biológico es importante las dos formas que puede tomar el parásito según el momento en el que se encuentre de su ciclo biológico (figuras 2 y 3):

- **Promastigote:** es la forma flagelada del parásito que se encuentra en el hospedador invertebrado (mosquito *Phlebotomus* spp. o *Lutzomya* spp.), es su forma infecciosa. Su forma es alargada, terminada en un flagelo móvil y un kinetoplasto asociado mientras que el núcleo se sitúa en su porción central. Su reproducción es asexual por fisión binaria. Una vez el vector pica a una persona, este le inyecta promastigotes.

- **Amastigote:** tiene forma redondeada y parasita las células del sistema reticuloendotelial del hospedador vertebrado donde se reproduce asexualmente por fisión binaria. Esta forma no presenta flagelo. Presenta un núcleo central y un kinetoplasto.

En un primer momento, el mosquito hembra se coloca en la piel del humano, saliva y pica para conseguir sangre con el fin de poder madurar sus huevos. En este momento, al haber salivado llegan promastigotes a la piel. Una vez allí, se activa la respuesta inmune por lo que los promastigotes son fagocitados por macrófagos, en ellos se forma un fagosoma que va madurando y da lugar a la vacuola parasitófora. En este instante, los promastigotes cambian su forma a amastigotes que se van multiplicando dentro de la célula hasta reventar la vacuola parasitófora. De esta manera, cuando dicha vacuola se rompe, se liberan más amastigotes que infectan al huésped. Dependiendo del tropismo de *Leishmania spp.*, se infectarán células más superficiales o profundas dando lugar a los diferentes cuadros que se explican a continuación. A partir de aquí, el ciclo continúa nuevamente cuando un mosquito hembra no infectada se alimenta de sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes. Una vez dentro de ella, los amastigotes se transforman nuevamente en promastigotes, dividiéndose en su intestino y migran a la probóscide, órgano bucal de los mosquitos, perpetuando el ciclo nuevamente cuando vuelve a picar.

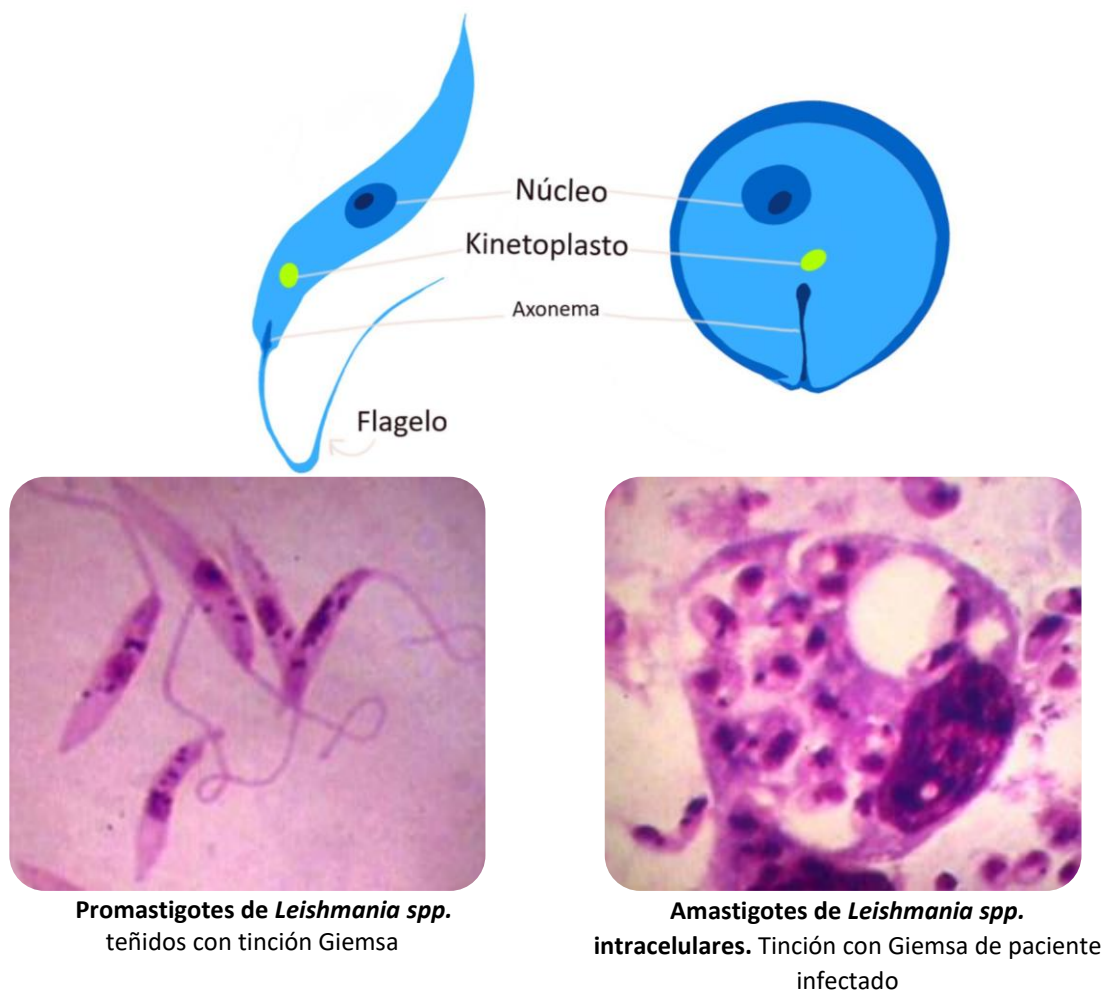


Figura 3. Formas del parásito según ciclo biológico (15)

Cuadros clínicos

Una vez comentadas las diferentes especies y la zona donde se encuentran, es importante saber que las características del parásito y su tropismo son las que determinan el tipo de cuadro que se manifestará en la persona afectada. Principalmente, pueden darse tres tipos de cuadros clínicos que se comentan a lo largo de este epígrafe:

- Leishmaniasis cutánea
- Leishmaniasis muco-cutánea
- Leishmaniasis visceral o *kala-azar*

A continuación, se muestra en la figura 4 la distribución geográfica de los tres cuadros clínicos de leishmaniasis.

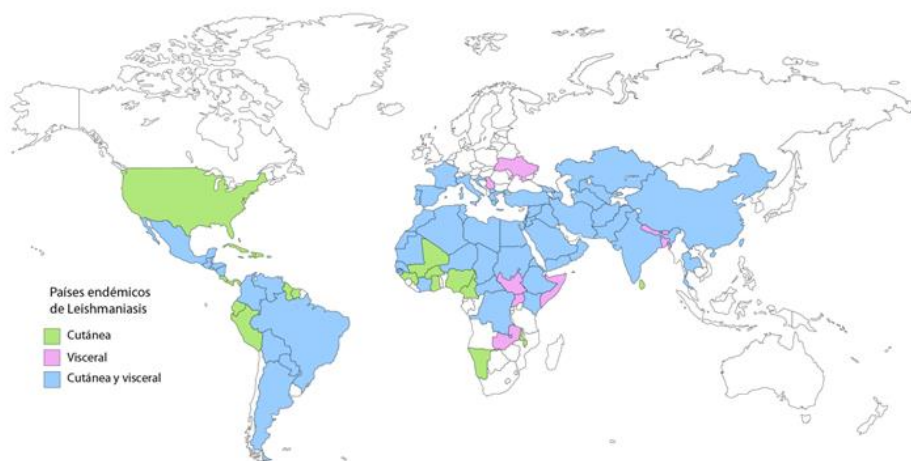


Figura 4. Distribución geográfica de los cuadros clínicos de *Leishmania* spp. (16)

Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea se produce en las zonas del cuerpo que se encuentran expuestas a las picaduras de los mosquitos. Principalmente, se ven afectadas cara, orejas, antebrazos, manos, piernas y tobillos. Se ha observado que el periodo de incubación suele ser de entre 1 y 4 semanas, aunque puede durar años. En estos casos, es de vital importancia realizar una buena anamnesis en la que se le pregunte por posibles viajes a zonas endémicas.

En un primer momento, aparece una pápula eritematosa en el lugar donde se ha producido la picadura y generalmente también se asocia prurito. Consecuentemente, la piel de esta zona presenta un aumento de la temperatura local. El tamaño de esta pápula puede ser de entre 1 y 10 milímetros. Tras unos días, la pápula se convierte en una vesícula y, posteriormente, se transforma en una pústula que cuando se rompe, espontáneamente o mediante el rascado de la misma, se observa una lesión nodular ulcerada de bordes sobreelevados diferenciados. Estas úlceras descritas pueden mantenerse a lo largo del tiempo desde meses a incluso años. A pesar de lo que pueda

sugerir esta descripción, este tipo de lesión no suele ser dolorosa y no da lugar a una infección secundaria.

Reflejada en la figura 5, se muestra una de estas úlceras que se pueden disponer agrupadamente o de forma solitaria. Al mismo tiempo, no es raro observar úlceras en otras zonas lejanas a las de la picadura por autoinoculación mediante el rascado. Sistémicamente, no hay fiebre, pero sí que se suele observar una adenopatía regional. En otros casos, no se produce la ulceración de la picadura que se mantiene en un estado vegetativo. Finalmente, hay que subrayar que en algunos casos este tipo de afección puede mejorar espontáneamente, desde la periferia en dirección a la zona central, dejando un área de menor pigmentación y una ligera deformación (17).

Las recidivas de estas lesiones son frecuentes y pueden llegar al 33%, en estos casos se denomina *Leishmania recidivans* (13). Estas lesiones se pueden reabrir y tienen características similares a las de las lesiones iniciales. Por último, hay que mencionar que existe una forma abortiva en la pápula que es regresiva.



Figura 5. Aspecto de las lesiones que aparecen en la piel en los cuadros de leishmaniasis cutánea (18)

Leishmaniasis cutánea diseminada

La leishmaniasis cutánea diseminada se produce por una falta de respuesta inmune que provoca que los amastigotes se diseminen por la circulación sanguínea y linfática afectando al resto del organismo. De esta forma, las lesiones se pueden observar por todo el cuerpo, en algunos casos también por las mucosas, respetando cuero cabelludo. Las lesiones pueden ulcerarse o no como en la forma local. Clínicamente, puede presentar fiebre, malestar general, linfedema y linfadenopatías. Además, pueden aparecer nódulos a nivel de mucosas respiratorias que pueden dar lugar a un cuadro de obstrucción de la vía respiratoria. Por sus características, la forma cutánea diseminada es muy difícil de tratar y no suele tener resolución espontánea.

Leishmaniasis muco-cutánea

Otro de los posibles cuadros es la leishmaniasis muco-cutánea que, principalmente, está producida por el complejo *L. brasiliensis*. A nivel histológico, este protozoo invade estructuras de la nasofaringe y destruye su mucosa. Generalmente, es un cuadro de aparición insidiosa por lo que, al inicio, la afectación suele ser mínima y solo se suele observar algo de inflamación y prurito a nivel local.

Cronológicamente, la infección comienza a nivel de la mucosa nasal descendiendo por boca, faringe y laringe, además de afectar a nariz y labios. Las úlceras que aparecen en este cuadro evolucionan hasta mostrar un borde necrótico. En cuanto a la afectación nasal, esta puede incluso acabar con los cornetes nasales y destruir el cartílago nasal que clínicamente se reproduce con un olor fétido. A nivel oral, se caracteriza por producir odinofagia por lo que en algunos casos donde la afectación nasofaríngea es grave, los pacientes pueden presentar un aspecto caquéctico. Otras estructuras que pueden verse afectadas son la úvula y las amígdalas que, en casos extremos, pueden ser aniquiladas. Por último, otro aspecto a destacar de la exploración es que se pueden observar adenopatías locorregionales dolorosas a la palpación.

Leishmaniasis visceral o kala-azar

La leishmaniasis visceral o kala-azar es la presentación más grave que puede producirse la cual sin tratamiento es casi siempre mortal. Este cuadro se produce por especies de *Leishmania spp.* que muestran un tropismo especial por células más profundas. Epidemiológicamente, la leishmaniasis visceral es producida por *L. donovani* en el Viejo Mundo y por *L. infantum* en el Nuevo Mundo, principalmente. Como se observa en la imagen de la distribución geográfica (fig. 4), está presente en muchos países, pero el 90% de los casos solo se concentran en seis de ellos (India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil) (19).

Los grupos de riesgo son, principalmente, niños en edad preescolar, personas con inmunodeficiencias y aquellos que tengan cuadros de desnutrición. Si la infección no se trata la muerte es un desenlace prácticamente seguro dentro de los 2 primeros años de evolución. En algunas zonas de África es difícil de diagnosticar y tratar tanto por no tener recursos suficientes como por la gran cantidad de movimientos que se ve obligada a realizar la población debido a conflictos bélicos (20).

Clínicamente, el periodo de incubación puede extenderse entre 3 y 8 meses. En el momento en que el cuadro aflora, se caracteriza por la aparición gradual de episodios febriles que son irregulares durante al menos 2 semanas, hepatoesplenomegalia que se desarrolla según avanza el cuadro, anemia y pérdida de peso (fig. 6). En otros casos se ha observado que la fiebre puede ser continua pero no suele ser lo más típico. Sin embargo, lo más frecuente es que dicha fiebre sea ondulante a lo largo del día.

El cuadro se inicia con febrícula y con un empeoramiento del estado general progresivo que con el paso del tiempo se traduce en caquexia, astenia, hepatoesplenomegalia, piel marronácea, diátesis hemorrágica, amenorrea, edemas y nódulos cutáneos que van apareciendo y persistiendo durante todo el transcurso de la enfermedad. Todos estos síntomas afectan mucho al paciente por lo que su sistema inmune ya indefenso no puede hacer frente a otras infecciones o cuadros secundarios (neumonía, TBC, diarreas, hemorragia digestiva...) que suelen ser los que producen la muerte.



Figura 6. Los pacientes con kala-azar se caracterizan por gran pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (21)

Post kala-azar

El post kala-azar es un cuadro que aparece en algunos pacientes que se han recuperado completamente de un cuadro de leishmaniasis visceral. En ellos, su piel presenta un rash macular, papulomacular o nodular que se inicia alrededor de la boca y se expande desde ahí a otras zonas como brazos, tronco y restos de la cara. Es un cuadro frecuentemente observado en Sudán e India donde un 50% y 5-10% de los pacientes, respectivamente, manifiestan este cuadro (22). Cronológicamente suele aparecer entre los 6 meses a 1 año tras la recuperación total de un paciente con leishmaniasis visceral. En estos casos, los pacientes se llegan a considerar una fuente de infección potencial para el resto de las personas.

Coinfección leishmaniasis-VIH

La leishmaniasis como ya se ha visto es una infección complicada que perjudica seriamente al sistema inmune dejándolo indefenso ante otros cuadros. A este problema, se le suma el aumento de la incidencia de la coinfección leishmaniasis-VIH que, en parte, se atribuye a que tienen una distribución que se solapa entre sí. Se ha observado que en aquellas áreas donde es más frecuente la leishmaniasis visceral, aquellas personas VIH+ son más proclives a desarrollar kala-azar. Por lo tanto, la leishmaniasis se muestra como una infección oportunista asociada al VIH. Según la OMS, el riesgo de padecer kala-azar aumenta entre 100 y 2300 veces en pacientes VIH+ mientras que en el Sur de Europa se ha observado que hasta el 70% de los casos de leishmaniasis visceral están asociados a infección VIH (23).

La importancia de la coinfección se basa en que ambas forman un circuito de retroalimentación positiva entre ambas, es decir, pacientes VIH+ son más vulnerables a tener un cuadro de leishmaniasis visceral mientras que, a su vez, los cuadros de dicha implican un aumento de la replicación del VIH y que, por lo mismo, este progrese más rápidamente a desarrollar SIDA. De este mismo modo, el tratamiento de la leishmaniasis, que ya de por sí es complicado, suele fallar más en estos casos. Por lo que en un contexto donde los pacientes VIH+ no se estén tratando con antirretrovirales, se observan más recidivas y defunciones más tempranas. Del mismo modo, estos pacientes se convierten en una fuente de infección para los vectores facilitando la transmisión y

expansión de estas enfermedades. Sabiendo esto, hay que añadir que los movimientos migratorios y la facilidad para viajar a otros puntos del planeta hacen que la leishmaniasis y el VIH hayan alcanzado áreas geográficas más amplias.

En la década de los 90, surgió *Leishnet* como una red mundial para la vigilancia de la *Leishmania spp.* donde se observó que la mayoría de casos provenían de la cuenca europea. De hecho, fue en 2001 cuando se vio que más del 50% de los casos de coinfección se daban en España (23). En esta época, se solía decir que el típico paciente coinfectado en el sur de Europa era un varón joven consumidor de drogas vía parenteral infectado con *L. infantum* donde, lo más probable, era que la infección se diese por la picadura de un vector, por el empleo de jeringuillas contaminadas o, en algunos casos, por reactivación de la infección tras años de latencia.

La clínica en estos casos de coinfección se suele manifestar como una leishmaniasis visceral pero paradójicamente las manifestaciones suelen volverse más leves o atípicas según disminuye el recuento de linfocitos TCD4. Particularmente, no se suelen ver anticuerpos contra *Leishmania spp.* sobre todo, en aquellos casos donde la infección por VIH era previa a la de leishmaniasis. Sin embargo, era posible ver amastigotes con más facilidad en las tinciones de las muestras de biopsia extraídas de médula ósea (24).

En definitiva, la coinfección leishmaniasis-VIH es de gran relevancia ya que ambas entre sí hacen que la evolución sea más rápida acortando la esperanza de vida y dando pie a la expansión de ambas enfermedades.

Diagnóstico

El diagnóstico de leishmaniasis se debe realizar en base a la clínica, hay que sospecharla teniendo en cuenta el cuadro que presenta el paciente y el contexto epidemiológico en el que ha surgido, y mediante la realización de pruebas parasitológicas o pruebas serológicas.

Para el diagnóstico de confirmación se pueden hacer diversas pruebas como:

- Biopsia y cultivo (hígado, bazo, médula ósea, ganglios o piel)
- Prueba de Montenegro
- PCR específica para *Leishmania spp.*
- Prueba de aglutinación directa
- Prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes

Como ejemplo, en la figura 3, se observan los amastigotes dentro de un macrófago tras realizar un frotis en una muestra de médula ósea.

Prevención

No existen vacunas o medicamentos que sirvan como profilaxis por lo que hay que emplear otras medidas para evitar la enfermedad. La falta de inversión por parte de la industria farmacéutica junto a los bajos recursos en algunas de las zonas donde es

endémica hace que la prevención se sustente en medidas que eviten la picadura de los mosquitos vectores. De este modo, las medidas más empleadas son:

- Control de los vectores
- Control de reservorios animales
- Proporcionar información a la población
- Uso de mosquiteras impregnadas en insecticidas
- Uso de insecticidas interiores
- No realizar actividades entre el ocaso y el amanecer
- Uso de repelente en zonas expuestas.

Tratamiento de la leishmaniasis

La terapia convencional para el tratamiento de la leishmaniasis se basa en quimioterapia, esto es así porque *Leishmania spp.* es un microorganismo eucariota. De este modo, los fármacos empleados presentan muchos efectos secundarios y toxicidad asociada ya que interfiere con los sistemas de metabolismo eucariota por lo que, al no haber especificidad, se ven afectadas células sanas también.

El primer tratamiento frente a *Leishmania spp.* nace a principios del siglo XX. En 1910, Gaspar Vianna muestra que el uso de antimoniales puede ser efectivo frente a la leishmaniasis. Ya en 1920, se consiguen sintetizar los primeros antimoniales pentavalentes que entraron en el mercado en los años 40 como Pentostan® y Glucantime® que siguen siendo el tratamiento de elección en muchos lugares hoy en día. Como resultado del uso continuado de estos antimoniales, se fueron generando resistencias que se han intentado solventar con el empleo de otros fármacos que mostraron actividad leishmanicida como anfotericina B y su formulación liposomal, miltefosina, paromomicina y pentamidina. Estos fármacos a pesar de ofrecer nuevas opciones en el tratamiento no son los ideales ya que no se han desarrollado específicamente para este fin, sino que la casualidad ha hecho que se observase actividad leishmanicida durante su estudio. Ante esta situación, estamos ante una falta de medicación específica para la leishmaniasis lo que conlleva innumerables efectos adversos, baja eficacia frente al parásito y un aumento progresivo de las resistencias.

Antimoniales pentavalentes

Los antimoniales fueron los primeros fármacos que se empezaron a utilizar en los años 20. Principalmente, estibogluconato de sodio (Pentostam®) y meglumina antimoniato (Glucantime®) han sido y siguen siendo un pilar básico en el tratamiento de todas las formas de leishmaniasis. En sus inicios, se empleaba el tartrato de potasio de antimonio (Sb III) pero fue sustituido posteriormente por los antimoniales pentavalentes (V) ya que tenían menos efectos secundarios.

A pesar de que el mecanismo de acción de los antimoniales no está muy claro, parece que actúan sobre el metabolismo energético principalmente mediante el bloqueo de la formación de ATP y GTP (fig. 7). Para explicar el mecanismo de acción de los antimoniales se aceptan dos hipótesis. En una de ellas, se habla de la capacidad del parásito o de las células infectadas para convertir las moléculas de Sb (V) en Sb (III) que sería el agente activo. Sb (III) se caracteriza por unirse muy fuertemente a los restos

sulfhidrilo formando conjugados con tripanotona (factor de virulencia) que le permite resistir al estrés oxidativo que rodea a la célula infectada. Así mismo, Sb (III) se caracteriza por ser capaz de inhibir la enzima tripanodiona reductasa que se encarga de reciclar la tripanodiona oxidada para mantenerla en una su forma reducida. Por otro lado, Sb (V) actúa entrando a las células infectadas, pero también es capaz de actuar sobre la topoisomerasa del promastigote específicamente, de esta manera, se pudo demostrar que presentaba efecto tanto en promastigotes como en amastigotes reduciendo la adenosín trifosfato (ATP) y la guanosín trifosfato (GTP) a adenosín difosfato (ADP) y guanosín difosfato (GTP) (25).

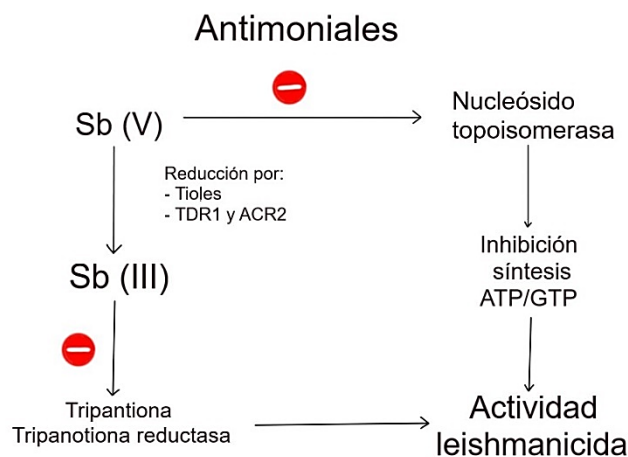


Figura 7. Mecanismo de acción de los antimoniales modificado de J.H. No (25)

Los antimoniales pentavalentes, ambos reflejados estructuralmente en la figura 8, son efectivos en la mayoría de los casos, pero tienen ciertos inconvenientes que hay que tener en cuenta. Su vía de administración es parenteral por lo que es necesario que el tratamiento se administre en régimen hospitalario. Además, la duración del tratamiento según el tipo de afectación es de varias semanas (leishmania cutánea requiere 20 días, mucosa y visceral requieren de al menos 28 días). Estas pautas pueden alargarse según el tipo de paciente. La necesidad de plantear un tratamiento de tantas semanas presenta bastantes efectos secundarios que a pesar de ser en gran parte reversibles son de vital importancia. El tratamiento ha de ser monitorizado y tener datos previos para valorar cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, hepatitis, insuficiencia renal, pancitopenia, etc. Otros efectos secundarios que se pueden presentar son dolor abdominal, vómitos, diarrea y dolor en el lugar de administración en los casos en los que se administre una inyección intramuscular (26).

En los últimos 30 años, la aparición de resistencias ha dificultado que estos tratamientos sean los suficientemente eficaces. Una de las zonas que primeramente se vio afectada fue la región de Bihar en el norte de la India. En esta región, se observó en los años 80 que un 30% de los pacientes que padecían leishmaniasis no respondían al tratamiento habitual que se basaba en una dosis baja, en pautas cortas de un máximo de 10 días. Por ello, se realizó un cambio en la posología aumentándola y alargando el tiempo de administración provocando que en los años posteriores el porcentaje de no respondedores aumentase drásticamente hasta un 59% (27). Los aumentos paulatinos que se hacían hasta llegar a la dosis máxima y las pausas que se realizaban para poder

sobrellevar la toxicidad de este tratamiento provocaron principalmente la aparición de resistencias.

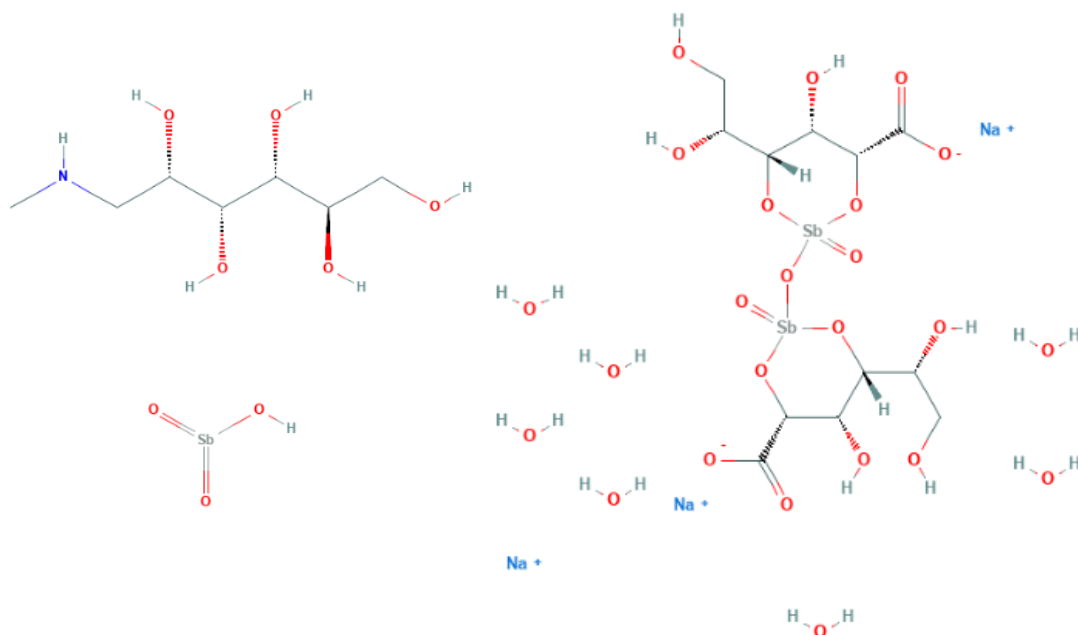


Figura 8. Estructura química de los antimoniales. Antimoniato de meglumina (izquierda) y estibogluconato de sodio (derecha) (28,29)

En resumen, los principales inconvenientes que plantean los antimoniales pentavalentes es que son caros, son difíciles de administrar, la duración del tratamiento es larga y poseen una gran toxicidad. Por otro lado, no se pueden administrar a embarazadas, la dificultad que conlleva darlos a enfermos pluripatológicos y, por último, la disminución de su efectividad en la actualidad por la aparición de resistencias. Por ello, aparecieron los tratamientos de segunda línea.

Tratamientos de segunda línea

Como alternativas a los antimoniales pentavalentes se encuentran fármacos como la anfotericina B y la pentamidina, por esto se les considera tratamientos de segunda línea. Estos se emplean en aquellas zonas en las que hay resistencias a los antimoniales pentavalentes como en la zona de Bihar en la India (24).

Anfotericina B

La anfotericina B, producida por *Streptomyces nodosus*, pertenece al grupo de los antibióticos macrólidos con la cualidad de que es, además, antifúngico. Esto es así porque tiene la capacidad de unirse al ergosterol, un componente que tienen en común los hongos y la membrana de *Leishmania spp.* Al presentar una naturaleza química anfipática, es decir, de poseer tanto una parte hidrofílica como una hidrofóbica hace que sea un compuesto ideal para desempeñar su acción. Esta estructura tan peculiar está reflejada en la figura 9.

Su mecanismo de acción se basa en la unión a estos compuestos de ergosterol haciendo que se formen canales por los que hay un eflujo de iones y moléculas, por

tanto, aumenta la permeabilidad de la membrana provocando la muerte de la célula. También es capaz de unirse a esteroides intracelulares afectando a las vías de la respiración celular contribuyendo al proceso de apoptosis (30). Al principio, la anfotericina B deoxicolato se empleaba como rescate o segunda línea para tratar tanto la leishmaniasis cutánea como la leishmaniasis visceral. A su vez, era fármaco de primera línea en las zonas en las que las resistencias eran conocidas. Sin embargo, presenta similares problemas a los antimoniales pentavalentes ya que la toxicidad y los efectos secundarios son frecuentes.

Posteriormente, se empezaron a utilizar formulaciones lipídicas, de las cuales se hablará más adelante en el trabajo, donde los lípidos sustituyen al deoxicolato. Esta diferencia permite una que la anfotericina liposomal sea mejor tolerada que su forma convencional por ser menos nefrotóxica y presentar menos reacciones con su infusión (24,31).

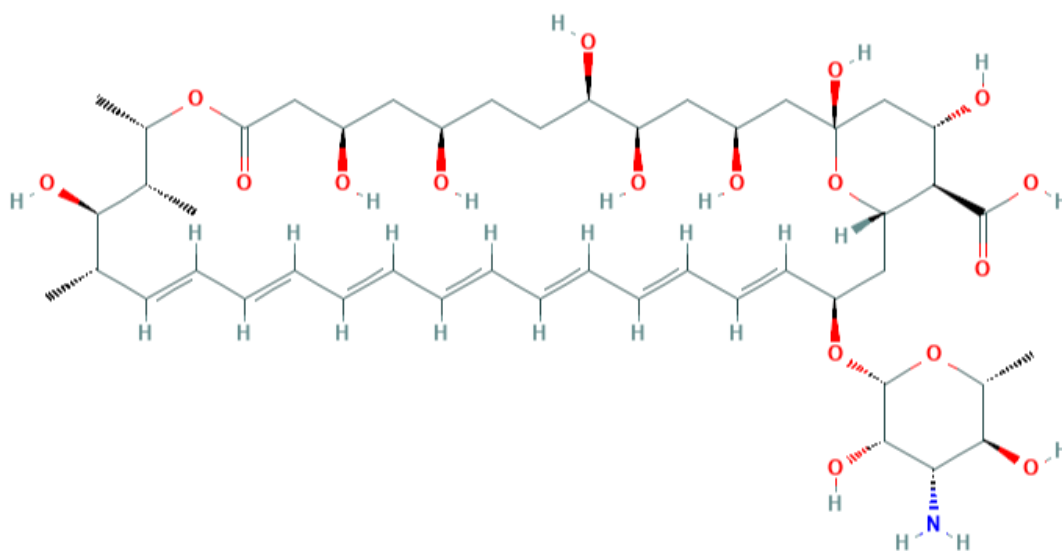


Figura 9. Estructura química de anfotericina B (32)

Miltefosina

La miltefosina es un análogo de alquilfosfocolina que inicialmente se desarrolló en la década de los 80 dirigido al tratamiento de neoplasias. Durante su desarrollo se observó que tenía propiedades antiprotozoarias convirtiéndose de esta manera en el primer tratamiento para la leishmaniasis que se podía administrar por vía oral y tópica. Se ha descrito que actúa afectando a la integridad de la membrana fosfolipídica y a la actividad de las mitocondrias dando lugar a la apoptosis. Su estructura química está representada en la figura 10 (33).

En 2002, fue aprobada en la India para el tratamiento de pacientes que presentaban resistencias al tratamiento habitual frente a leishmaniasis cutánea y visceral. Se mostró mediante un estudio que con el tratamiento con miltefosina a dosis 2,5 mg/kg/día en un ciclo de 28 días se consiguió que la tasa de curación en pacientes,

tanto tratados previamente como no tratados, fuese del 94% (34). La mayor ventaja que posee la miltefosina es que su administración no requiere hospitalización por lo que el coste de dicho tratamiento es muy inferior comparado a aquellos que requieren hospitalización y vigilancia continua.

A pesar de ello, se han observado efectos secundarios como vómitos, diarrea, toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Además de esto, no se puede administrar en embarazadas ya que tiene un efecto teratogénico sobre el feto (35). Otra cuestión que hay que tener en cuenta es que, en aquellos pacientes con alteraciones gastrointestinales, este fármaco debería de administrarse vía parenteral vigilando que no se produzca tromboflebitis y hemólisis (36). Se ha observado que la sensibilidad de la miltefosina varía según la especie siendo *L. donovani* la más sensible y *L. major* la menos sensible por lo que este hecho tiene repercusión a la hora del tratamiento. Ejemplo de ello se refleja en el estudio realizado por Soto y cols. en Sudamérica donde se compararon datos entre Colombia y Guatemala en los que se observó que en Colombia donde predomina *L. panamensis* la tasa de curación fue del 91%, mientras que en Guatemala donde predominan *L. braziliensis* y *L. mexicana* la tasa de curación solo llegó al 53% (37).

A pesar de ello, este fármaco también presenta inconvenientes como son la generación de resistencias por características como su larga semivida (una semana), su uso indiscriminado y la presencia de genes que puedan ser responsables de inactivar la absorción de fármacos (38).

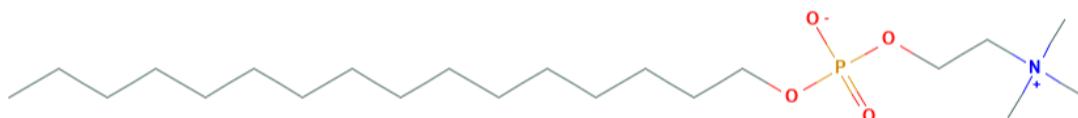


Figura 10. Estructura química de la miltefosina (39)

Paromomicina

La paromomicina (Humantin®) es un antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos producido por *Streptomyces riomusus* que se emplea tanto para la leishmaniasis visceral vía parenteral como para la leishmaniasis cutánea vía tópica (fig. 11). La paromomicina es un medicamento que es capaz de actuar frente a *Leishmania spp.*, *Entamoeba spp.* y *Cryptosporidium spp.* En los años 60 se descubrió que tenía actividad frente a *Leishmania spp.* pero no fue hasta 2006 cuando fue aprobada por el gobierno de la India para el tratamiento de pacientes con leishmaniasis visceral (40).

Según Shalev-Benami y cols. el mecanismo de acción de la paromomicina se basa en interferir en la traducción del ribosoma citosólico y la inhibición del crecimiento de *Leishmania spp.* (41). En cuanto a los efectos secundarios de la paromomicina en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, se mencionan dolor en el lugar de administración (55%), ototoxicidad reversible (2%) y elevación de transaminasas (6%). Para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, se han descrito efectos adversos locales en el lugar de aplicación de la pomada (dolor, prurito, escozor e inflamación).

Vacunación

A pesar de que las medidas para el control de la enfermedad han permitido que la incidencia disminuya en aquellas áreas más afectadas, aun no hay una vacuna que pueda ser empleada para dicho fin. A pesar de ello, se han realizado dos ensayos clínicos con vacunas. En Sudán hay un ensayo clínico en fase II donde se observó que se conseguía una buena inmunogenicidad, pero su eficacia era solamente del 43% (46). Por otro lado, otro ensayo en Estados Unidos ha conseguido llegar a la fase I tras demostrar que era bien tolerada (47). A pesar de estos avances prometedores, aun es necesario investigar mucho más para dar con una vacuna que sea eficaz para conseguir inmunidad frente a *Leishmania spp.*

Tabla 2. Resumen de fármacos convencionales frente a la leishmaniasis y sus efectos adversos.

Fármaco	Cuadros	Vía	Efectos adversos	Limitaciones
Antimoniales	LC LMC LV	Parenteral	Cardiotoxicidad Hepatotoxicidad Nefrotoxicidad Pancitopenia Pancreatitis	No indicado en Bihar (India). Larga hospitalización Contraindicado en embarazadas
Anfotericina B deoxicolato	LC LMC LV	Parenteral	Cardiotoxicidad Edema pulmonar Nefrotoxicidad Hipopotasemia Hipomagnesemia Shock	Conservación en frío (2-8 °C) Larga hospitalización Contraindicado en embarazadas
Miltefosina	LV	Oral Tópica	Vómitos intensos Nefrotoxicidad Hepatotoxicidad Hemólisis Tromboflebitis	Larga semivida Efecto limitado si patología digestiva Contraindicado en embarazadas
Paromomicina	LC LMC LV	Intramuscular Tópica	Ototoxicidad Hepatotoxicidad Síntomas locales (dolor, prurito, escozor, edema) Dermatitis de contacto Urticaria Linfadenitis	Tratamiento prolongado, poco útil en monoterapia Valorar riesgo/beneficio en embarazo
Pentamidina	LC LV	Parenteral Intramuscular	DM Hipoglucemia grave Hepatotoxicidad Cardiotoxicidad Nefrotoxicidad Shock	Eficacia muy reducida en LV Empleo en embarazo si ausencia de alternativas

LC: Leishmaniasis cutánea; LMC: Leishmaniasis muco-cutánea; LV: Leishmaniasis visceral

La tabla 2 resume de forma muy breve los tratamientos convencionales que se han mencionado con una descripción breve sobre sus indicaciones, sus vías de administración, efectos adversos y limitaciones de estos.

Listeriosis

La listeriosis es una infección producida por *Listeria monocytogenes*, bacteria intracelular anaerobia facultativa. Histológicamente se observa como bacilos cortos, gram positivos que se puede observar de forma aislada o formando cadenas cortas. Este cuadro es desencadenado por la ingesta de alimentos contaminados con dicha bacteria. La mayor parte de las veces se corresponde a casos aislados, aunque puede dar lugar a brotes epidémicos por fallos en el control de la producción alimentaria.

Los cuadros infecciosos que produce se dividen entre invasivos y no invasivos siendo los primeros de gran relevancia puesto que su mortalidad llega a rozar el 30%. Se ha elegido a *Listeria monocytogenes* en este trabajo como ejemplo de bacteria intracelular y por la aparición de resistencias, lo cual desemboca en una falta de eficacia en el tratamiento (9).

Epidemiología

Las dos principales vías para que se produzca listeriosis son mediante la ingesta de alimentos contaminados o vía vertical de la madre al feto. Alrededor del 99% de los casos son producidos por la ingesta de alimentos que se han contaminado en su origen, por no haber sido tratados correctamente en su producción o porque se han consumido crudos o sin lavar. Además de estas dos vías, también se puede producir de forma zoonótica a través del contacto con animales infectados y, por último, de forma nosocomial a nivel hospitalario bien por asistencia a partos o por manejo de muestras contaminadas. En la mayoría de los casos, una ingesta mínima de esta bacteria puede, o bien, no producir ningún síntoma o producir un cuadro autolimitado. Sin embargo, esto no sucede así dentro de los grupos de riesgo que se ven especialmente afectados. A estos grupos de riesgo pertenecen embarazadas, recién nacidos, personas de la tercera edad, inmunodeprimidos, personas con enfermedades autoinmunes o enfermedades crónicas.

Lo habitual es que la listeriosis se presente de forma esporádica, sin embargo, esta infección ha adquirido gran importancia al poder dar lugar a brotes epidemiológicos. En España, el último y mayor brote de listeriosis se produjo el pasado agosto de 2019 en Andalucía debido al consumo de carne mechada contaminada. El periodo de duración de este brote fue desde el 7 de julio de 2019 hasta el 13 de septiembre de 2019 llegando a contabilizar 222 casos confirmados en diferentes regiones del país (10).

Su capacidad de dar lugar a brotes ha hecho que la listeriosis forme parte del grupo de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) desde 2015. La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) se ha encargado de su vigilancia desde entonces y ha llegado a notificar hasta 1369 casos en el periodo 2018-2019, dándose alrededor

de 300 a 400 casos anualmente. La tasa de incidencia según dicho informe fue aumentando paulatinamente siendo de un 0,64 en 2015 y llegando a 1,06 en 2018 por cada 100.000 habitantes por lo que se ha demostrado que es bastante superior a la mediana de la Unión Europea (0,34). Esta tendencia al aumento se justifica por la implantación de la obligación de declaración de esta enfermedad. Así mismo, en dicho informe se observa que el número de casos se ve aumentado en las edades extremas destacando que en ese periodo se dieron 51 casos en lactantes y tasas elevadas en los grupos de tercera edad.

Durante este mismo periodo se llegaron a notificar hasta ocho brotes de unos tres casos por brote en los que se observó que seis de ellos fueron por transmisión vertical y los dos restantes se debieron a pequeños brotes intrafamiliares por el consumo de alimentos contaminados. Todos estos casos se dieron como casos esporádicos o pequeños brotes intrafamiliares. La edad media de los casos que se notificaron se encontraba entre los 65-70 años. En este periodo el número de defunciones fue de 124 con una letalidad global de 9,1% siendo más letal en los mayores (48). Debido a la gran relevancia de estos brotes por el impacto que tienen en la sociedad es importante encontrar nuevas estrategias tanto para evitarlos como para tratarlos de la mejor forma posible.

Patogénesis

Como ya se ha comentado, *Listeria monocytogenes* es una bacteria intracelular anaerobia facultativa por lo que tiene unas características que la pueden hacer especialmente invasiva siendo capaz de atravesar diferentes barreras fisiológicas como la intestinal, la barrera hematoencefálica (BHE) y la placenta. Sus características le permiten crecer y sobrevivir en diversos tejidos y que el acceso del tratamiento hasta el patógeno en algunos casos sea complicado. Tras la ingesta de la bacteria, el ciclo infeccioso (figura 13) que hace *Listeria monocytogenes*, es el siguiente:

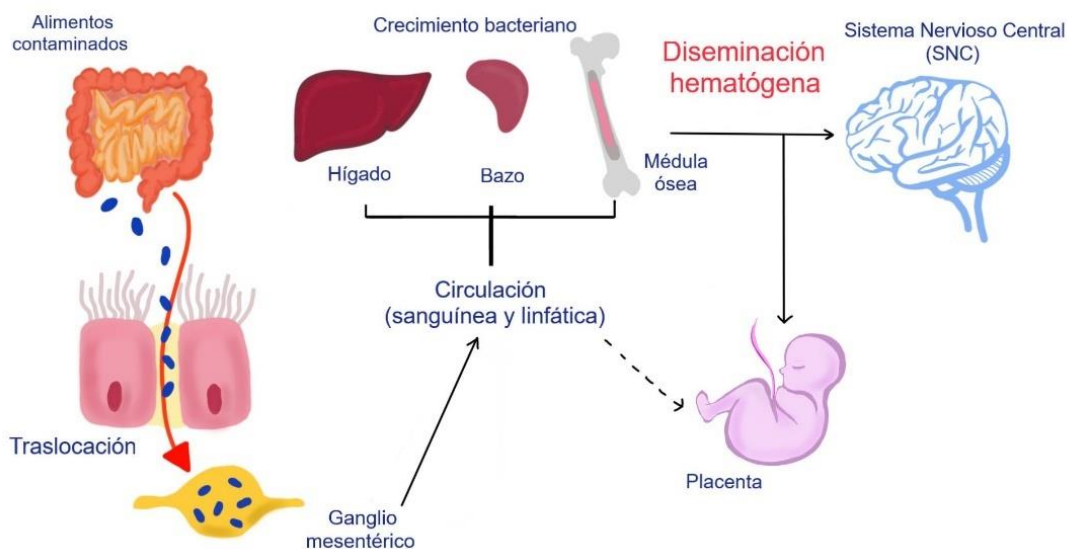


Figura 13. Esquema del ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*

En primer lugar, *Listeria monocytogenes* entra mediante la ingesta de alimentos contaminados y sobrevive dentro del aparato digestivo ya que es capaz de resistir al pH

ácido del estómago. Posteriormente, cruza la barrera intestinal a nivel de colon distal con posterior invasión de los enterocitos. A continuación, entra en la circulación tanto sanguínea como linfática, alojándose, a su vez hígado, bazo y médula ósea donde la bacteria se multiplica intracelularmente. Tras multiplicarse, es capaz de diseminarse vía sanguínea pudiendo llegar incluso a atravesar la BHE y llegar al sistema nervioso central (SNC) y/o atravesar la placenta y llegar al feto en pacientes embarazadas.

Existen cuatro momentos claves en la infección por *Listeria monocytogenes* que son los siguientes (49):

- Invasión celular
- Lisis de la vacuola de fagocitosis
- Multiplicación intracelular
- Invasión de células adyacentes

El primer paso se produce con la invasión celular donde la bacteria se adhiere a la célula huésped y la invade mediante fagocitosis donde queda englobada en una vacuola. Esta unión se produce mediante la interacción de las internalinas A y B de *Listeria monocytogenes* con los receptores E-cadherina y Met de la célula huésped. En segundo lugar, se produce la lisis de la vacuola de fagocitosis por la acción de la toxina hemolítica y citolítica listeriolisina O (LLO) que forma poros y por las fosfolipasas fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) y fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC) por lo que la bacteria queda libre en el citoplasma donde es capaz de sobrevivir. En tercer lugar, la bacteria se multiplica intracelularmente y, por último, es capaz de infectar células adyacentes por la acción de la proteína ActA donde se polimerizan filamentos en uno de los polos formando una especie de cola de cometa que permite el movimiento y facilita la invasión de células vecinas. A partir de aquí, según la virulencia será capaz de trasladarse a otras zonas y dar lugar a cuadros mucho más graves (49). Todos estos procesos se encuentran esquematizados en la figura 14.

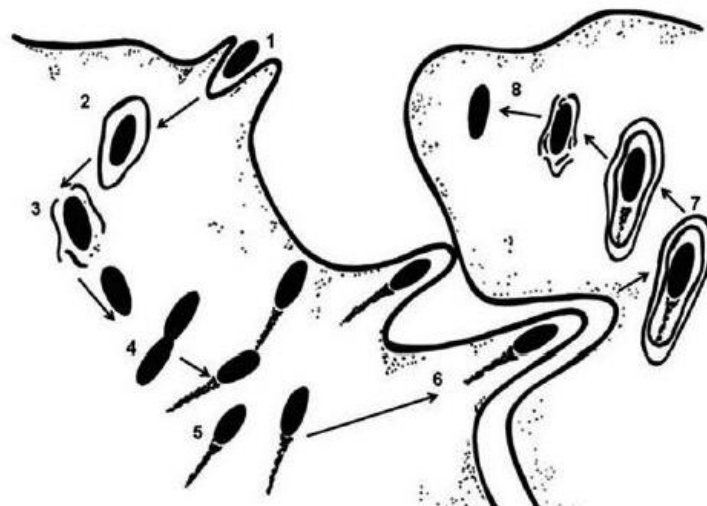


Figura 14. Esquema del ciclo intracelular de *L. monocytogenes*. 1. Entrada en la célula huésped; 2. Supervivencia dentro de la vacuola parasitófora; 3. Salida al citosol; 4. Replicación en el citosol; 5. Movimiento mediante la polimerización de actina; 6. Propagación de célula a célula; 7. Supervivencia en fagosomas secundarios; 8. Escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo (50)

Clínica

Los cuadros que puede producir *Listeria monocytogenes* se pueden dividir en dos para facilitar su comprensión:

- Listeriosis no invasiva
- Listeriosis invasiva

La listeriosis no invasiva se caracteriza generalmente por ser una gastroenteritis benigna que no causa demasiados problemas mientras que la listeriosis invasiva se caracteriza por ser capaz de diseminarse y atravesar las barreras del cuerpo haciendo que por este motivo la infección sea mucho más peligrosa y se vuelva crónica, lo que dificulte su tratamiento.

Listeriosis no invasiva

Los cuadros de listeriosis no invasiva suelen dar lugar a gastroenteritis autolimitadas que se producen unas 24 horas después a la ingesta de alimentos contaminados. En algunos casos puede ser asintomática, pero, por lo general se produce un cuadro pseudogripal con cefaleas, mialgias, fiebre, dolor abdominal, náuseas y gastroenteritis inespecífica. El pronóstico en estos, en principio, es bueno ya que la mayoría de los afectados no presentará un cuadro de mayor gravedad. En caso de que el afectado esté dentro de los grupos de riesgos será necesario tratarlo y vigilarlo estrechamente para evitar complicaciones.

Listeriosis invasiva

Existen tres factores fundamentales para el desarrollo de listeriosis invasiva:

- Pertenecer a un grupo de riesgo
- Ingerir un gran inóculo
- Virulencia de la cepa

El periodo de incubación en estos casos se amplía desde una semana hasta dos meses inclusive. La presentación de cuadros de listeriosis invasiva no es lo más frecuente pero su mortalidad es alta (30%) por lo que es necesario sospecharla rápidamente e instaurar tratamiento antibiótico precoz.

Según la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC), los cuadros de listeriosis invasiva se pueden subdividir en (50):

- **Listeriosis septicémica:** Es la forma invasiva más frecuente Su periodo de incubación medio es de 2 días y se caracteriza por producir fiebre asociada a un cuadro pseudogripal y/o diarrea (20%) que, en algunos casos, se ve complicada con cuadros de meningoencefalitis o septicemia pudiendo dar lugar a shock séptico.

- **Neurolisteriosis:** La predilección de la listeriosis por el SNC provoca que en los cuadros invasivos se den, principalmente, casos de meningoencefalitis, donde la mortalidad es de hasta un 40%, aunque también se presenta como meningitis crónica,

cerebritis, rombencefalitis y abscesos. La afectación del SNC se asocia a una disminución del nivel de conciencia y suele dar lugar a secuelas neurológicas como parálisis del nervio facial en el 30% de los casos.

- **Infección materno-fetal o neonatal:** Estos casos se producen por el paso de la bacteria desde la madre infectada al feto vía transplacentaria. El pronóstico para la gestante es favorable mientras que en el feto o neonato es bastante malo. El periodo de incubación medio llega a rondar el mes. En las madres, la clínica es más benigna produciendo un cuadro pseudogripal asociado a fiebre. Sin embargo, las madres pueden llegar a presentar contracciones uterinas. Tanto es así que el 90% de los embarazos se verán afectados donde en un 20% de los casos se producirá un aborto, un 40% de los casos dará lugar a un parto prematuro y un 25% de los casos dará lugar a partos a término con sufrimiento fetal agudo y/o posterior infección neonatal invasiva.

En los neonatos, la infección se puede reflejar de forma temprana en la primera semana por infección intrauterina o de forma tardía por adquirir la infección en el canal de parto. En la forma temprana, los neonatos suelen presentar cuadros de septicemia grave con una tasa de mortalidad de entre el 20% y el 60% mientras que en las formas tardías predominan los cuadros de meningitis.

Diagnóstico

Clínicamente el diagnóstico es complicado ya que los síntomas que produce son inespecíficos tanto en las formas leves como en las formas invasivas es por ello por lo que en formas esporádicas pueda ser difícil reconocerla, pero, dentro de un contexto de brote epidémico sea más fácil sospecharla. La confirmación se puede realizar mediante la toma de muestras de fluidos para conocer la presencia de la bacteria. Para confirmar el diagnóstico se pueden tomar muestras estériles como pueden ser líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico (LA), o tejidos estériles como placenta y tejido fetal.

En la mayoría de los casos, se empieza con un hemocultivo que es positivo en el 40-75% de las meningitis por *Listeria monocytogenes* y el 55% de las mujeres embarazadas. Para los casos de listeriosis materno-fetal se debe realizar un cultivo placentario (50). A veces también puede ser de utilidad la realización de coprocultivo que, a pesar de tener una sensibilidad y especificidad bajas, sirven en el estudio de brotes epidemiológicos y portadores (51). También se podría pensar en realizar serologías con anticuerpos antilisteriolisina, teniendo en cuenta que la listeriolisina O es específica de la bacteria, pero no es recomendable ya que su sensibilidad es baja.

En resumen, lo importante es ser capaz de descartar la infección en aquellos que tengan síntomas y pertenezcan a los grupos de riesgo en el contexto de un brote de listeriosis sobre todo en el caso de las embarazadas y en las personas que presenten cuadros cono afectación neurológica.

Prevención

La prevención de los brotes de listeriosis es algo clave en la industria alimentaria que se encarga del control de los alimentos. Sin embargo, hay cuestiones a las que todos

tenemos que prestar especial atención a la hora de manipular alimentos siguiendo las recomendaciones para la conservación y refrigeración de los alimentos, manteniendo buenas medidas de higiene, preparándolos adecuadamente antes de utilizarlos lavándolos bien, consumiendo leches pasteurizadas y alimentos bien cocinados.

Tratamiento de la listeriosis

Generalidades

Teniendo en cuenta que existen cuadros leves en los cuales los síntomas son muy inespecíficos hay muchos casos en los que no se da tratamiento. Pero en aquellos casos donde se sospecha una infección por *Listeria monocytogenes* el antibiótico de primera elección es la ampicilina pudiéndose asociar a gentamicina. Para el tratamiento de un caso estándar de infección invasiva, se deben emplear dosis altas y la duración del tratamiento debe rondar al menos dos semanas para que sea efectivo.

Plan de tratamiento

Para el tratamiento de la listeriosis se emplean β -lactámicos principalmente ampicilina que puede asociarse a gentamicina (aminoglucósido), que es la asociación más frecuentemente empleada. En aquellos pacientes que sean alérgicos a penicilina, se emplea cotrimoxazol. En embarazadas, si el cuadro es leve, se administra amoxicilina vía oral; si es invasiva sin afectación del SNC ampicilina o, en casos de embarazadas alérgicas, eritromicina o cotrimoxazol; si además hay afectación neurológica se debe asociar gentamicina a la ampicilina. Todas estas opciones están recogidas en la tabla 3 según las pautas de la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC).

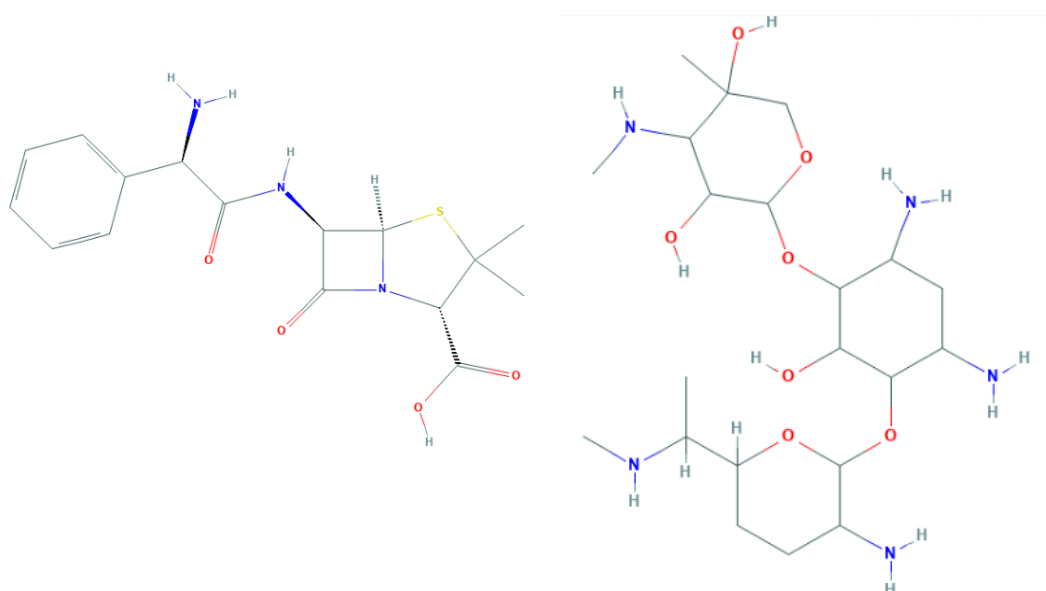


Figura 15. Estructura química de ampicilina (izquierda) y de gentamicina (derecha)
(52,53)

Tanto la ampicilina como la gentamicina (fig. 15) son los agentes terapéuticos más empleados, ya que la mayoría de las cepas son sensibles a ellos. A pesar de que *Listeria monocytogenes* ha permanecido relativamente estable en cuanto a términos de

sensibilidad, hay que tener en cuenta que puede haber cambios ambientales que pueden conferir resistencia como pueden ser cambios en el pH, el frío o el estrés hídrico y que, además, en algunos casos ya se han descrito fallos al tratamiento con los fármacos de primera elección.

Tabla 3. Pautas de tratamiento según la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC)

Situación clínica	Tratamiento
Adultos	
Infección invasiva sin afectación SNC	Ampicilina IV 2g/4h por 10-14 días +/- Gentamicina IV 5-7 mg/kg/día por 7 días Si alergia penicilina: Cotrimoxazol IV 5/25 mg/kg/ 8h
Infección invasiva con afectación SNC	Ampicilina IV 2g/4h por 21 días + Gentamicina IV 5-7mg/kg/día por 7 días
Embarazadas	
Enfermedad leve/cuadro pseudogripal/síntomas gastrointestinales sin fiebre	Si hemocultivo - Amoxicilina VO 1g/6h por 7 días Si hemocultivo + tratar como infección invasiva sin afectación del SNC
Infección invasiva sin afectación del SNC	Ampicilina IV 2g/4h por 14 días Alergia a penicilina: eritromicina IV 4g/día por 14 días o cotrimoxazol IV 80/400 mg/6h por 14 días
Infección invasiva con afectación del SNC	Ampicilina IV 2g/4h por 21 días + Gentamicina IV 5-7 mg/kg/día por 7 días
Niños	
Infección neonatal sin afectación del SNC	Ampicilina IV 200-300 mg/kg/día divididos en cuatro dosis por 14 días
Infección neonatal con afectación del SNC	Ampicilina IV 300-400 mg/kg/día divididos en 4 dosis por 21 días + Ceftriaxona IV 80-100 mg/kg/día por 7 días

Nuevas perspectivas en el tratamiento de enfermedades intracelulares

Los tratamientos farmacológicos que se emplean habitualmente son efectivos en gran medida, sin embargo, en el caso de los microorganismos intracelulares dicho tratamiento se torna más complicado por el mero hecho de que patógenos se encuentran protegidos en el interior de las células y pasan desapercibidos al sistema inmune. Existen varias cuestiones que hacen que el tratamiento frente a infecciones intracelulares sea más complejo ya que es necesario emplear agentes terapéuticos que sean capaces de entrar en las células y en una concentración adecuada para ser efectivos frente a dichos microorganismos. En otras palabras, es necesario que estos agentes terapéuticos sean capaces de atravesar la membrana celular y lleguen al citoplasma a una concentración idónea (la concentración mínima inhibitoria o CMI) para conseguir inhibir el crecimiento bacteriano.

Uno de estos problemas se puede encontrar en el caso de la listeriosis en los que el tratamiento de elección se basa, como muestra la tabla 3, en el empleo de ampicilina y gentamicina. Estos antibióticos, por características, como su naturaleza química, pueden provocar que la respuesta en algunos casos sea menor a la esperada. La ampicilina pertenece al grupo farmacológico de los beta-lactámicos, estos fármacos al ser poco lipofílicos tienen una baja penetración intracelular por lo que, teniendo en cuenta que la listeriosis es una bacteria intracelular, este hecho presenta problemas para su tratamiento. Por otro lado, la gentamicina forma parte del grupo de los aminoglucósidos que al ser administrados son captados por las células mediante endocitosis, por lo que en el citoplasma son retenidos dentro de los lisosomas provocando, en muchos casos, una degradación del fármaco (54).

Las estrategias empleadas en conseguir una buena biodisponibilidad y efectividad de los fármacos se han centrado a lo largo de los años en aumentar la dosis pauta y en emplear la vía parenteral para su administración. No obstante, estas estrategias solo han hecho empeorar la situación. Con el inicio de la era de los antibióticos en 1929, su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas se fue expandiendo y se empezaron a utilizar también en otros campos como en la producción cárnica o en la alimentación de algunos animales. Su uso indiscriminado ha propiciado que hayan surgido numerosas resistencias a lo largo de los años.

En el caso de los antiparasitarios, la mayoría de los medicamentos empleados llevan en el mercado más de 70 años con lo que su difícil manejo también ha propiciado la aparición de resistencias. Un ejemplo de ello es el tratamiento frente al parásito *Leishmania spp.* en el que todos los agentes terapéuticos que se emplean presentan grandes limitaciones o efectos secundarios graves. Durante su tratamiento, es imprescindible valorar y seguir muy estrechamente al paciente, estudiar su estado general y realizar controles periódicos para valorar la citotoxicidad del tratamiento. Además, sus pautas requieren periodos de hospitalización largos que, sumándolo a la necesidad de vigilancia continua, conllevan un alto costo que los hacen poco accesibles en las zonas más damnificadas por este parásito. A todos estos problemas es necesario remarcar que su difícil manejo ha dado lugar a muchas resistencias que se traducen en una disminución de su efectividad y, por tanto, menores tasas de curación. Al mismo tiempo, tanto la nula inversión por parte de las farmacéuticas para la formulación de

nuevos antiparasitarios como la falta de vacunas comercializadas para generar la inmunidad necesaria en la población de áreas endémicas hacen que sea necesario encontrar soluciones de una forma rápida y efectiva.

Como posible solución a estos inconvenientes en la eficacia terapéutica de estos fármacos se encuentra el empleo de la Nanotecnología. Desde que Richard Feynman, ganador del Premio Nobel en Física en 1965, acuñó el término de nanotecnología en 1959 en su conferencia *"There's Plenty of Room at the Bottom"* (Hay mucho espacio en el fondo), esta ciencia comenzó su desarrollo, disparándose a partir de los años 70. Se define como el estudio y desarrollo de sistemas en escala nanométrica. Un nanómetro equivale a una mil millonésima parte de un metro (fig. 16). Esto permite la manipulación de materiales a escala atómica y molecular con el propósito de solucionar problemas gracias a una interacción directa del material con los componentes celulares debido a su similitud de tamaño y con ello contribuir a diferentes campos de la ciencia. En esta escala los materiales presentan características muy diferentes que cuando se presentan en tamaño macro o microscópico, un ejemplo es el área superficial ya que según disminuye el tamaño de una partícula, su área superficial total aumenta de forma exponencial lo que permite diseñar nanosistemas inteligentes con un amplio abanico de aplicaciones (fig. 17).

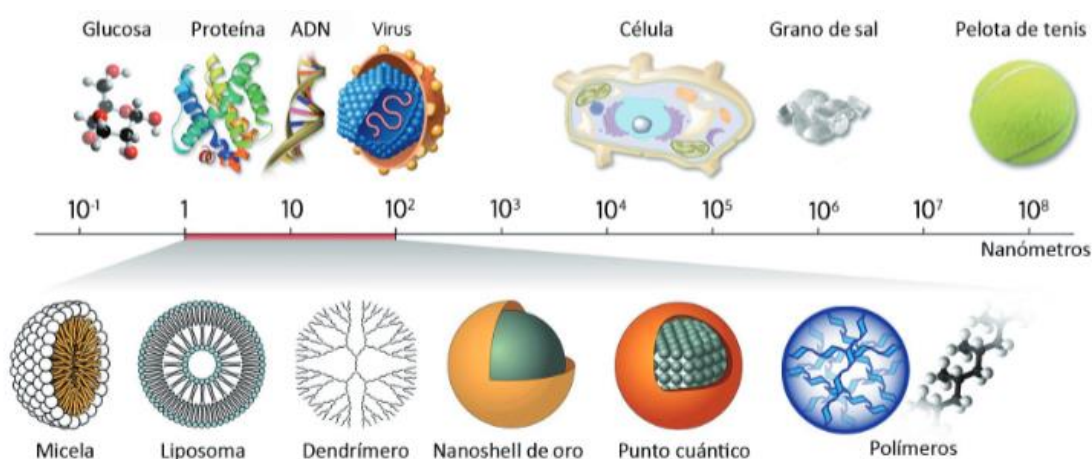


Figura 16. Nanosistemas y otros ejemplos en escala nanométrica (55)

Una de las áreas con más potencial es el empleo de la nanotecnología en la Medicina, cuyo concepto se conoce como nanomedicina. Se define como la rama de la Medicina que mediante la aplicación de conocimientos sobre nanotecnología es capaz de producir materiales en escala nanométrica que sean de utilidad en el tratamiento y prevención de enfermedades. Gracias a esta disciplina se han conseguido desarrollar nuevos sistemas para el transporte de medicamentos convirtiéndose en una rama con mucho potencial en el área médica.

Nanotransportadores

En el mercado existen muchos tipos de nanotransportadores, como muestra la figura 16, sintetizados a partir de materiales de diferente naturaleza con cualidades fisicoquímicas específicas (composición, tamaño, carga...) que pueden modificarse

según las necesidades. El diseño de nanosistemas para el transporte de fármacos se lleva realizando desde hace más de 50 años, por lo que se han observado algunas premisas indispensables que deben tener para que sean idóneos vehiculizando fármacos y alcanzando, de forma eficaz y segura, la diana farmacológica (56):

- Biocompatibilidad y biodegradabilidad.
- Alta capacidad de carga de fármaco
- Evitar una liberación temprana del fármaco.
- Proteger el fármaco eficazmente sin interactuar con él evitando su degradación o metabolización.
- Liberación controlada del fármaco en el tejido diana

Las características físicas de estos nanotransportadores definen su comportamiento en gran parte pues influyen en su absorción, distribución, resumiendo en su biodisponibilidad. Estos nanosistemas requieren tener un tamaño determinado para ser capaces de llevar los fármacos por el torrente sanguíneo hasta su diana específica. Por ello, es necesario que el tamaño de estos sea superior a 5 nm para que no escapen de la circulación sanguínea a través del endotelio. Asimismo, es necesario que tengan un tamaño lo suficientemente grande como para poder llevar una cantidad significativa de fármaco. Se ha observado que las partículas con tamaños inferiores a 200 nm tienen una mayor biodisponibilidad y permanecen más tiempo en la circulación respecto a partículas de un tamaño superior, por lo que, la permeabilidad de estas partículas para atravesar barreras dependerá en gran medida a su tamaño. la composición química de su superficie también es un factor importante ya que los nanotransportadores que tienen una superficie hidrófoba son fagocitados por las células del sistema reticuloendotelial con mayor rapidez (57). Esta tendencia a ser captados por los macrófagos es una prometedora estrategia para el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos intracelulares (58). Respecto a la forma, los nanosistemas de transporte de fármacos se han desarrollado con múltiples formas (esférica, cilíndrica, sólida, en forma de tubos, etc.) por lo que la elección de la forma también tiene un papel relevante según el uso que se le vaya a dar al nanotransportador. Como se ha dicho previamente, el área superficial en estos nanosistemas es mayor lo que permite añadir en su superficie determinados compuestos que mejoren su rendimiento y su especificidad. (54,56)

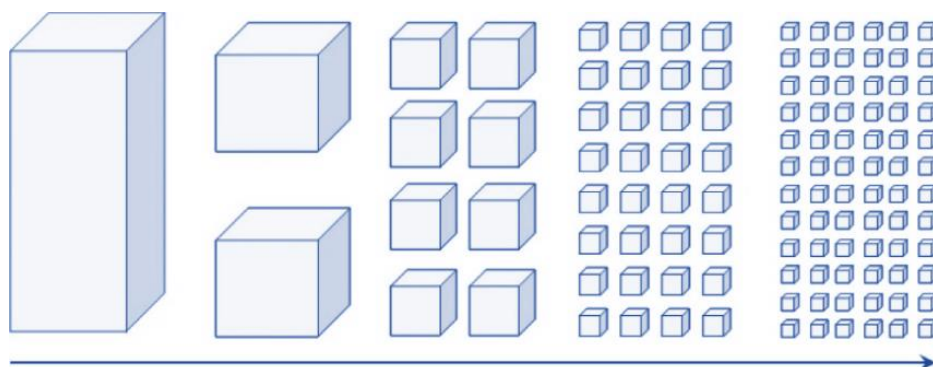


Figura 17. Aumento de la superficie relativa en relación al tamaño

De este modo, han surgido una gran variedad de nanosistemas que permiten transportar fármacos. Algunos de ellos son los liposomas, las nanopartículas (magnéticas, de oro, sílica, sólidas lipídicas, poliméricas...), nanotubos de carbono, terpenoides o dendrímeros entre otros (fig. 18). En el caso de las enfermedades producidas por microorganismos intracelulares, los estudios para el desarrollo de estos nanosistemas se han basado en que estos microorganismos son fagocitados por macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial (SRE), por lo que el objetivo de estos nanotransportadores se centra en un diseño que les permita ser fagocitados por estas mismas células y así poder interaccionar directamente con el patógeno alojado en su interior. Esto es lo que se conoce como transporte pasivo.

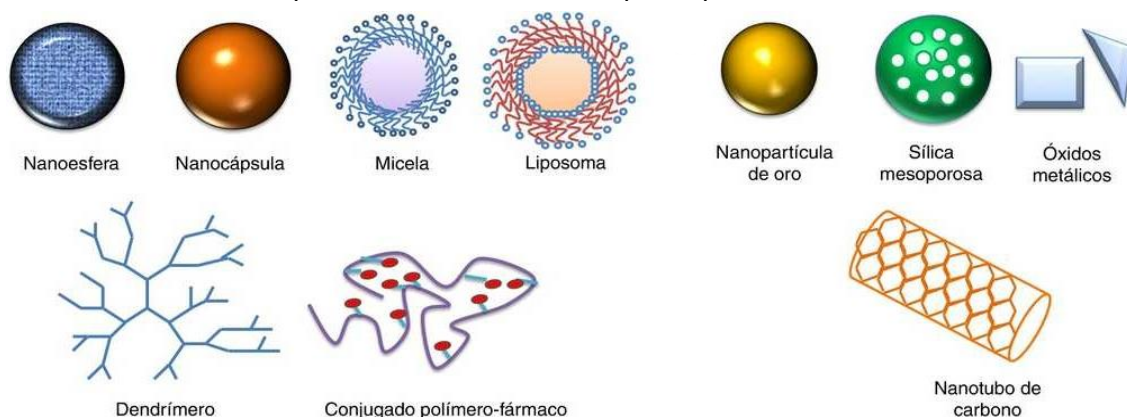


Figura 18. Representación esquemática de diferentes nanosistemas empleados en Nanomedicina (59)

El empleo de nanosistemas presenta ventajas (tabla 4) como que los nanosistemas permiten que los fármacos se distribuyan mejor por el organismo y, por tanto, aumente su biodisponibilidad. Al estar encapsulados, los fármacos están protegidos de posibles agresiones como la acción de algunas enzimas o cambios en el ambiente. La encapsulación de varios fármacos en un mismo nanosistema permite que haya un efecto sinérgico, mejorando la eficacia terapéutica. Así mismo, los nanotransportadores se pueden diseñar de forma de que sean dirigidos activa o pasivamente a su diana, es decir, que la superficie lleve un ligando específico para hacer que el nanosistema se dirija a una diana en concreto o aprovecharse de la acción de las células del SRE que fagocitan las partículas extrañas que se encuentren en sangre. Del mismo modo, los nanosistemas pueden diseñarse de manera que solo liberen los fármacos en determinadas situaciones como cambios en el pH, temperatura, presencia de luz ultravioleta (UV) o infrarroja (IR), etc. Por último, los tratamientos con nanosistemas mejoran la adherencia puesto que las pautas se reducen tanto en tiempo como en dosis y, con ello, los efectos secundarios por lo que es más probable que el paciente cumpla el tratamiento (54).

Aun así, existen algunos inconvenientes como son problemas de estabilidad, baja tasa de encapsulación que en algunos casos es insuficiente para ser eficaz terapéuticamente, la necesidad de procesos de esterilización y el coste de su producción. Es por ello, que sigue siendo necesario seguir investigando el campo de los nanosistemas con el fin de solventar estos inconvenientes (54).

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los nanosistemas

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Efectos adversos • Mayor dispersión en administración IV • Menor frecuencia de administración • Protección de los fármacos • Encapsulación de varios fármacos – sinergia – • Dirigidos activa o pasivamente a su diana • Control de la liberación • Mayor captación intracelular • Mejor actividad antimicrobiana • Mayor adherencia 	<ul style="list-style-type: none"> • Acumulación <ul style="list-style-type: none"> - Reacciones de hipersensibilidad - ↑ ROS ≈ Daño en tejidos sanos • Falta de estabilidad según el material • Baja capacidad de carga • Requieren esterilización • ↑ Coste de producción

Diversos estudios han empleado nanotransportadores de fármacos frente a enfermedades intracelulares y algunos de ellos han demostrado una mayor eficacia terapéutica, una mejor biodisponibilidad del fármaco, así como el empleo de menores dosis y, por tanto, menor toxicidad asociada en comparación a los tratamientos convencionales. Como resultado, los nanotransportadores ofrecen una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades producidas por patógenos intracelulares utilizando vías de entrada similares a las de los propios patógenos por lo que se convierten en una solución alentadora frente a la falta de efectividad de los tratamientos convencionales.

Liposomas

Los liposomas consisten en nanovesículas esféricas constituidas por bicapas lipídicas concéntricas rodeando a un núcleo acuoso por lo que son capaces de llevar tanto fármacos hidrosolubles como hidrofóbicos (fig. 19). Aquellos compuestos que sean hidrofóbicos se localizarán en la bicapa lipídica mientras que aquellos que sean hidrofílicos estarán en el espacio acuoso dentro de la vesícula. Los liposomas pueden presentar en su superficie diferentes moléculas que las hagan más reconocibles por los macrófagos (azúcares) o moléculas como el polietilenglicol (PEG) que ralenticen su fagocitosis, permitiendo mayor tiempo de distribución de los liposomas en el organismo. Las principales ventajas que presentan los liposomas son:

- Mayor retención y concentración en los tejidos diana
- Liberación prolongada de fármacos
- Transporte de varios fármacos de diferente naturaleza química
- Biocompatibles y biodegradables

Los liposomas al ser administrados por vía intravenosa son rápidamente captados por los macrófagos debido a su superficie lipídica. Mediante la fagocitosis, los liposomas entran en los macrófagos (célula diana de *Leishmania spp.* y *Listeria spp.*) donde liberan el fármaco ejerciendo su acción sobre el microorganismo. En el caso de la leishmaniasis, se ha experimentado con la encapsulación de fármacos antimoniales en liposomas de fosfatidilserina donde se ha determinado que con esta formulación era posible eliminar los amastigotes intracelulares de *L. infantum*. En uno de estos estudios se emplearon formulaciones liposómicas con antimonio de meglumina y sales de antimonio donde la formulación con antimonio de meglumina demostró ser 63 veces más efectiva que en su forma libre frente a amastigotes. No obstante, comparando ambas formulaciones lipídicas entre sí, los amastigotes de *L. infantum* eran 4 veces más susceptibles a las sales de antimonio liposomales que a liposomas de antimonio de meglumina. A pesar de este último dato, se observó que concentraciones 10 veces superiores de antimonio de meglumina no eran citotóxicas por lo que en se concluyó que la formulación con liposomas de antimonio de meglumina eran mejores por su eficiencia de encapsulación (11,7% vs 2,9%) y más seguras por su menor citotoxicidad (60).

Otro ejemplo del empleo de nanotransportadores es el desarrollo de la anfotericina B liposomal (AmBisome®) Esta formulación liposomal aceptada por la FDA y disponible en el mercado desde 1997, es el tratamiento de elección en las zonas en las que existe resistencia al tratamiento con antimoniales pentavalentes, así como, en la región del Mediterráneo en pacientes inmunocompetentes (61) También se emplea en pacientes coinfectados con VIH, pero en una pauta más larga(62). Además, en estudios experimentales con animales no se ha observado potencial teratogénico con lo que, aunque no se ha establecido el perfil de seguridad en embarazadas, este fármaco podría ser empleado si así lo requiere la situación (63). A pesar de que estas formulaciones presenten menos efectos secundarios, existen varios problemas a resolver ya que poseen una semivida corta y su coste es alto. Además, al ser un tratamiento que se está empleando con mayor frecuencia hay que tener en mente la posibilidad del desarrollo de nuevas resistencias en un futuro.

En otro estudio publicado en 2017 por Shadab y cols., se empleó Kalsome™10, una nueva anfotericina B liposomal. Esta formulación era capaz de inducir apoptosis tanto en amastigotes como promastigotes en *L. donovani* algo que no había sido observado mediante el empleo de anfotericina B libre. Así mismo, se comparó con la otra anfotericina B liposomal del mercado (Ambisome®) donde se constató que era necesario una dosis dos veces superior de Ambisome® para conseguir la misma respuesta que Kalsome™10 y la concentración de lípidos es menor conllevando menor citotoxicidad (64).

Por otro lado, sabemos que *L. monocytogenes* es sensible a una gran cantidad de antibióticos, pero a veces el manejo de las infecciones invasivas puede ser complicado ya que su forma de diseminarse en el organismo es yendo de célula en célula por lo que nunca queda desprotegida manteniéndose siempre en el interior de las mismas. Una de las maneras en las que se ha visto que se pueden solventar estos problemas es mediante el empleo de liposomas. En el estudio experimental llevado a cabo en 1985 por Bakker-Woudenberg y cols., se demostró que el empleo de liposomas cargados con ampicilina

mejoraba la velocidad de llegada del fármaco al tejido diana respecto al fármaco convencional mostrando diferencias significativas en cuanto a la efectividad del tratamiento en ratones infectados con *Listeria spp.* (65). Así mismo, otro estudio de los mismos autores elaborado en 1988 mostró que la composición lipídica de estos nanosistemas tenía efectos sobre el rendimiento de los fármacos. En dicho estudio *in vitro* sobre un cultivo de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados con *L. monocytogenes*, se emplearon dos tipos de liposomas que variaban su composición lipídica haciendo que uno fuera más fluido mientras que el otro era más sólido. Ambos tipos eran absorbidos en tiempos similares, sin embargo, los liposomas menos fluidos eran degradados más lentamente que los fluidos. Se llegó a esta conclusión después de emplear dos concentraciones de ampicilina, 50 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente. A 50 µg/ml los liposomas menos fluidos tardaban más en erradicar a *L. monocytogenes* y a 25 µg/ml eran incapaces de hacerlo cuando a dicha dosis los fluidos seguían teniendo actividad bactericida. Con estos estudios se evidencia que el procesamiento de los liposomas intracelularmente puede ser de gran trascendencia en el tratamiento de estas patologías, así como el diseño del nanosistema (66).

A pesar de las ventajas, enumeradas al inicio de este epígrafe, existen una serie de inconvenientes (67):

- Inestabilidad de las vesículas debida a la corta semivida de los liposomas. Esta inestabilidad puede dar lugar a la fuga accidental del fármaco con lo que no puede llegar a su diana y ejercer su acción.
- Baja carga de fármaco respecto a otros nanosistemas.
- Dificultad en su producción. Los procesos que se tienen que realizar son complejos y caros lo que hace dificulta una producción a gran escala.
- Para poder emplearlos, deben ser esterilizados, pero estos no pueden emplear calor, irradiación o químicos ya que los liposomas se degradarían con el aumento de la temperatura por lo que solo se pueden esterilizar mediante filtración mecánica que puede no ser del todo efectiva.

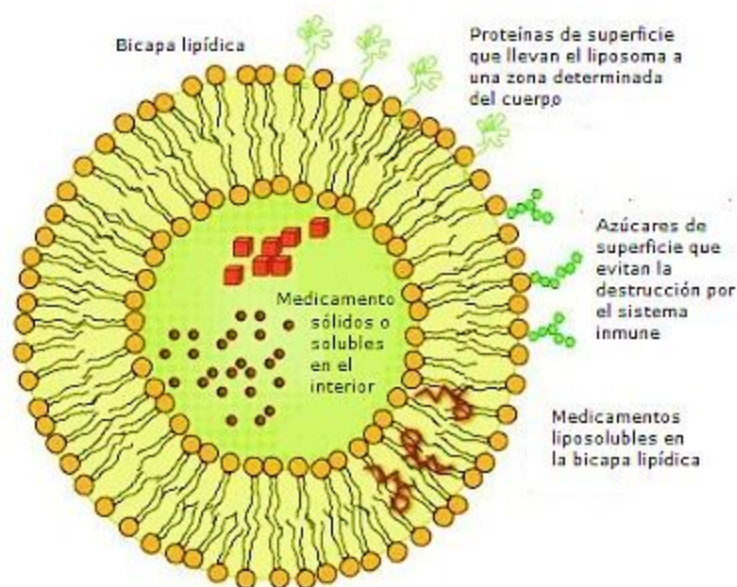


Figura 19. Esquema de la estructura de un liposoma (68)

Nanopartículas poliméricas

Los polímeros se forman por la unión de una o más moléculas de forma repetida formando así una cadena. Su tamaño es variable (entre 10 nm y 1000 nm) y se caracterizan por ser biodegradables además de ser muy versátiles ya que son capaces de llevar fármacos de múltiples formas (disueltos, encapsulados, unidos a su superficie, etc.). Fue en 1979 cuando se emplearon por primera vez nanopartículas de polialquilcianoacrilatos para el tratamiento de cáncer. Desde entonces se han ido desarrollando a lo largo de los años el empleo de polímeros para el transporte de fármacos. Según su composición pueden dividirse en sintéticos destacando el ácido poli (láctico-co-glicólico), y naturales como chitosán, albúmina, gelatina o alginato entre otros.

Las nanopartículas poliméricas pueden presentarse como nanosferas y como nanocápsulas. Las nanosferas se caracterizan por llevar el fármaco disperso uniformemente mientras que las nanocápsulas tienen una membrana que delimita la zona donde llevan encapsulado el fármaco. Ambas nanopartículas han sido representadas en la figura 20 para entender sus diferencias. Debido a sus ventajas, los polímeros son una gran herramienta a la hora de diseñar nuevos transportadores de fármacos. Existen tres posibles mecanismos con los que se consigue llevar el fármaco a la diana farmacológica:

- Reacción enzimática por la que el polímero se degrada y libera el fármaco en el lugar deseado.
- Difusión del fármaco tras hidratación de la nanopartícula.
- Desprendimiento del fármaco de la nanopartícula.

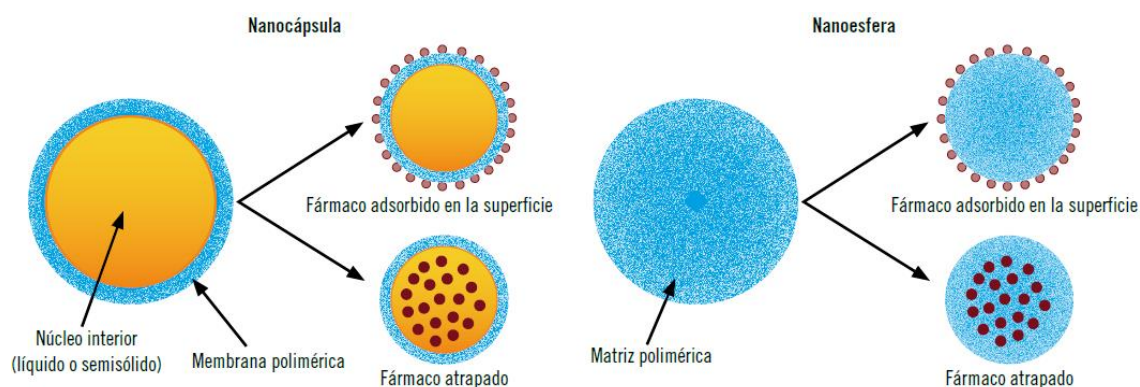


Figura 20. Esquema para mostrar las diferencias estructurales de las nanocápsulas y las nanosferas
(69)

Según diversos estudio, se sabe que existen plantas que contienen sustancias con actividad leishmanicida, pero al estudiarlas se observaba que su biodisponibilidad y solubilidad era baja. Una forma de suplir estos inconvenientes es mediante la encapsulación de estos posibles compuestos leishmanicidas en nanopartículas poliméricas. Ejemplo de ello, es la artemisinina, un metabolito de la planta *Artemisia annua*, que al encapsularla en nanopartículas de PLGA (poli láctico-co-glicólico), se ha conseguido mejorar su eficacia terapéutica y disminuir su toxicidad frente a amastigotes de *L. donovani ex vivo* y que comparado al empleo de artemisinina libre la reducción de amastigotes era significativamente mayor. Estos datos indican que el empleo de

artemisinina en nanopartículas de PLGA hacen que el fármaco sea más accesible a los macrófagos afectados y, por tanto, conseguir una mayor eliminación de los amastigotes. Así mismo, los datos fueron comparados con un grupo tratado con anfotericina B donde se reflejó nefrotoxicidad al elevar los niveles de urea y creatinina mientras que en el grupo tratados con artemisinina en PLGA no mostraron alteraciones significativas de enzimas hepáticas o alteración de las pruebas renales. A pesar de ello, el efecto inhibitorio de la artemisinina en PLGA no fue tan efectivo comparado a anfotericina B ($85.4 \pm 5.4\%$ versus $98.6 \pm 0.2\%$). Se concluyó que la combinación de artemisinina y fármacos convencionales podría ser una estrategia en el tratamiento de la leishmaniasis (70).

Otro de los compuestos que se han estudiado es el fenetil éster del ácido cafeico (CAPE). El CAPE es uno de los componentes del propóleo de las abejas con propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antibacterianas, inmunomoduladoras y leishmanicidas. Esta última se ha demostrado en el estudio *in vitro* realizado en 2017 por Abamor, mediante el empleo de nanopartículas de PLGA libres, nanopartículas de PLGA cargadas con CAPE y CAPE libre. Se observó que las formulaciones que contenían CAPE eran efectivas contra promastigotes y amastigotes de *L. infantum*. Así mismo, las nanopartículas con CAPE demostraron una mayor efectividad respecto a la forma libre. Además, también se estudió la estimulación de los macrófagos en la producción de óxido nítrico donde se constató que CAPE-PLGA y CAPE lo elevaban, 6,5 veces y 3 veces respectivamente, comparado a las nanopartículas de PLGA control (71). En consecuencia, el empleo de nanopartículas poliméricas puede ser una buena alternativa para el uso de fármacos contra la leishmaniasis.

En el caso de la *Listeria spp.*, la ampicilina también se puede introducir en nanopartículas poliméricas. Ejemplo de ello es un estudio experimental realizado por Youssef y cols. en ratones con listeriosis en el que se comparaba el tratamiento de listeriosis con ampicilina encapsulada en nanopartículas poliméricas de policianoacrilato de isohexilo frente a la administración de ampicilina libre. La ampicilina en nanopartículas demostró mayor eficacia en erradicar la infección que la ampicilina convencional (72).

Quantum dots

Los *quantum dots* son nanocristales semiconductores de un tamaño de entre 2 y 10 nm formados por entre 10 y 50 átomos (fig. 21) que suelen adoptar una forma esférica. El desarrollo de estos se ha empleado especialmente en los campos de electrónica y óptica, pero se ha visto que pueden emplearse también en Nanomedicina por su capacidad de emitir haces de luz monocromática.

Un ejemplo de ello son los *carbon dots*. Gao y cols. los produjeron a partir de ampicilina mediante un método de síntesis hidrotermal. Con ello, se observó actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* bajo luz visible incluso a muy bajas concentraciones. Se cree que el mecanismo de acción en este caso se basa en la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) que dañan la membrana bacteriana y provocan su muerte. Igualmente, gracias a las propiedades fluorescentes de los carbon

dots, se pueden obtener imágenes de fluorescencia cuando estos son añadidos por lo que aportan una nueva estrategia que pueden ser de utilidad en el futuro (73).

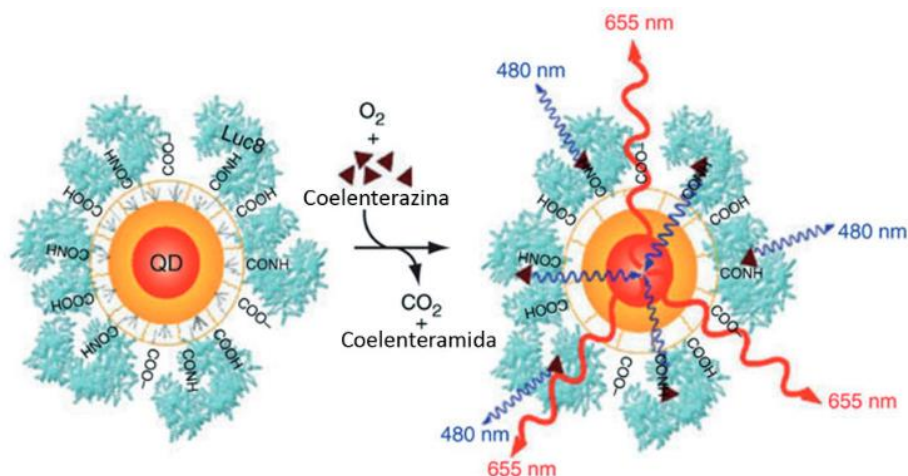


Figura 21. Esquema estructural de los quantum dots (55)

Nanopartículas sólidas lipídicas

Las nanopartículas sólidas lipídicas son un nanosistema híbrido pues reúne características de los liposomas y las de las nanopartículas. Son amorfos, no muestran una estructura de bicapa lipídica, aunque están formados por un núcleo sólido de lípidos estabilizado por surfactantes (fig. 22). Sus ventajas son su gran estabilidad y la posibilidad de llevar tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos.

En el caso de *Leishmania spp.*, Das y Devajaran realizaron un estudio *in vitro* en el que se empleó anfotericina B en nanopartículas sólidas lipídicas sobre promastigotes y amastigotes donde se observó que dicha formulación era más eficaz que Amfocare® (anfotericina micelar) y Fungisome® (anfotericina liposomal) y presentaban un mejor perfil de seguridad demostrando el potencial de estas nanoformulaciones (74) .

En el caso de *Listeria spp.*, Trinetta y cols. estudiaron el empleo de nanopartículas sólidas lipídicas cargadas con limoneno, una sustancia natural procedente de las cáscaras de los cítricos, empleado como antibacteriano. Para ello, se emplearon varias suspensiones microbianas de *L. monocytogenes* donde se observó que el limoneno cargado en estas nanopartículas era aún más efectivo que en su forma libre (75).

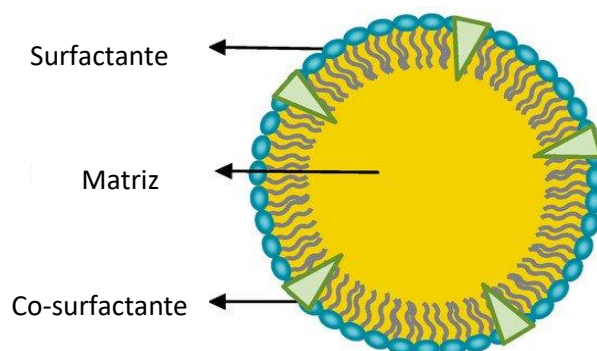


Figura 22. Esquema de la estructura de una nanopartícula sólida lipídica (76)

Dendrimeros

Los dendrimeros son macromoléculas globulares altamente ramificadas de un tamaño menor a 15 nm que presentan un núcleo central bien definido y una arquitectura periférica ramificada que les da una forma muy peculiar (fig. 23). Sus propiedades dependen de los radicales que presenten sus ramificaciones. Se han realizado varios estudios aprovechando su arquitectura para cargar fármacos alrededor de sus ramificaciones.

En el estudio de Jain y cols. se desarrollaron dendrimeros formados por un conjugado de muramil dipéptido, un glicopéptido que forma parte de las paredes celulares bacterianas y es capaz de aumentar las actividades fagocíticas de los macrófagos, y poli(propilenimina) (PPI) cargados con anfotericina B en los que se observó una disminución significativa de la toxicidad respecto a las formulaciones de anfotericina B que actualmente hay en el mercado (AmBisome® y Fungisome®). Además, dicha formulación mostró una actividad antiparasitaria mayor o equivalente frente a macrófagos murinos infectados con *L. donovani*. De este modo, estos dendrimeros cargados de anfotericina B podrían convertirse en una alternativa más que conveniente para el tratamiento de cuadros de leishmaniasis (77).

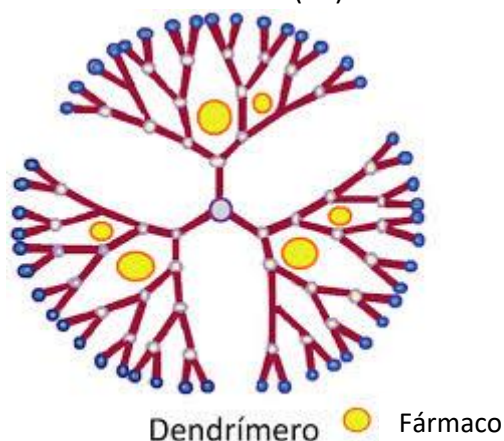


Figura 23. Esquema de la estructura de un dendrimer (55)

Nanopartículas de sílice mesoporosa

Las nanopartículas de sílice mesoporosa se caracterizan por estar compuestas de una matriz de sílice con poros en su superficie de entre 2 y 50 nm de diámetro que permiten alojar moléculas (fig. 24). Estas partículas presentan dos superficies que se pueden funcionalizar haciendo que la superficie externa responde a estímulos (internos: pH, enzimas, medios redox o externos: luz, ultrasonidos, campos magnéticos) que permite la liberación de la carga que permanece en la superficie interna (78).

Uno de los campos que podría beneficiarse es la industria alimentaria evitando la proliferación de *L. monocytogenes*. Como ejemplo, el estudio realizado por Duraisamy y cols. publicado en 2018 en el que se emplearon estas nanopartículas cargadas con cereína, una bacteriocina o péptido antimicrobiano, obtenido de *Bacillus cereus*, sobre zumos de manzana inoculados con *L. monocytogenes*. Este estudio consta de un grupo control (zumo sin cereína) y dos grupos experimentales (zumo con cereína libre y zumo con cereína cargada en nanopartículas de sílice porosa) donde se demostró que el

rendimiento era significativamente mejor en el grupo que empleaba las nanopartículas, haciendo a *L. monocytogenes* indetectable a los 12 días mientras que en el grupo con cereína libre persistía hasta el día 15. Así, las nanopartículas de sílice porosas pueden convertirse en una alternativa a los preservativos químicos empleados actualmente (79).

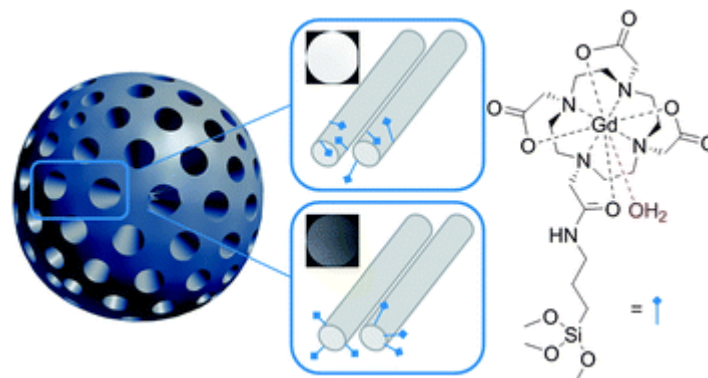


Figura 24. Esquema de una nanopartícula de sílice mesoporosa (80)

Nanopartículas metálicas

Finalmente, las nanopartículas metálicas y sus óxidos han sido otra forma de abordar el tratamiento de enfermedades intracelulares. Estas nanopartículas se incluyen por sus propiedades antimicrobianas aunque no forman parte del grupo de los nanotransportadores ya que no vehiculizan antibióticos en su interior. A pesar de que no se conoce exactamente qué mecanismos son los que dan lugar a sus propiedades antimicrobianas, son tres los que parecen más probables (81):

- Capacidad de generar radicales libres de oxígeno (ROS) que son capaces de afectar tanto a enzimas como al ADN de patógenos provocando apoptosis.
- Desintegración de membranas tras contacto ya que pueden deformarlas o dañarlas aumentando su permeabilidad y generando su ruptura.
- Liberación mantenida de iones desde su superficie que pueden inhibir enzimas de vital importancia.

Son muchos los metales que se han estudiado para la síntesis de nanopartículas (oro, plata, zinc, hierro, etc.) y en algunos casos se ha observado actividad leishmanicida. Uno de estos metales es la plata (fig. 25) que, históricamente, ya se empleaba en el siglo XVIII en soluciones coloidales para el tratamiento de infecciones. En la actualidad, mediante la nanotecnología ha sido posible sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs). En el estudio de Jebali y Kazemi se emplearon nanopartículas metálicas (plata, oro, óxido de titanio, óxido de zinc y óxido de magnesio) frente a *L. major*. Todas estas nanopartículas metálicas mostraron actividad leishmanicida, siendo las de plata las que mejores resultados obtuvieron. Así mismo, se observó que su rendimiento bajo radiación UV e IR aumentaba la actividad leishmanicida de estos nanosistemas, probablemente por aumento de la producción de radicales libres de oxígeno. Sin embargo, aunque estas nanopartículas tenían actividad leishmanicida en promastigotes, se observó que también tenían la misma toxicidad sobre los macrófagos, lo que se asoció a una falta de especificidad. A pesar de ello, se sugiere que la modificación de la superficie de la nanopartícula con otros compuestos como lecitina o anticuerpos puede

ser una estrategia para mejorar la biocompatibilidad siendo más efectivo frente al parásito y menos tóxico para las células (81).

En el caso de *L. monocytogenes*, Ahmadi y cols. sintetizaron nanopartículas de plata empleando *Chlamydomonas reinhardtii* como alternativa a los métodos de síntesis químicos. Posteriormente, se observaron las propiedades antibacterianas de estos nanomateriales constatando que tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* y que son capaces de reducir el nivel de expresión de la toxina listeriolisina O (82).

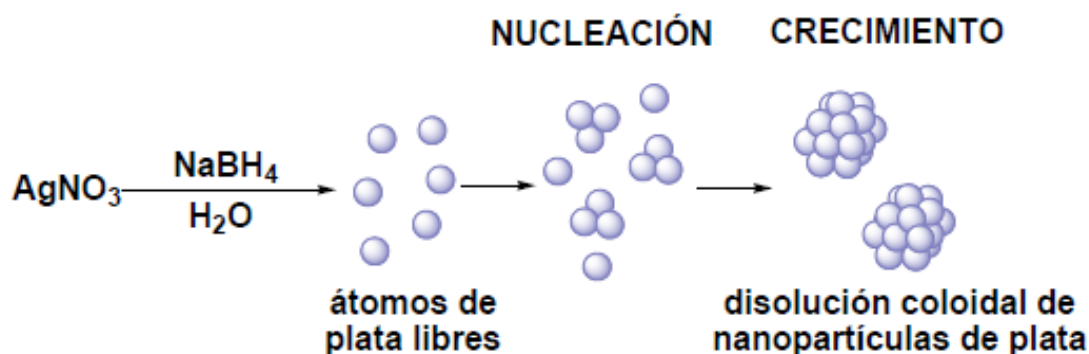


Figura 25. Esquematzación del proceso de formación de nanopartículas de plata

Discusión y conclusiones

El tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos intracelulares sigue siendo un reto hoy en día en la práctica clínica. La dificultad de estos tratamientos radica principalmente en la baja penetración de los agentes terapéuticos al interior de las células por lo que, para solucionar esta falta de efectividad, históricamente se ha recurrido a emplear tácticas poco prácticas como el uso de la vía parenteral, el aumento de las dosis y una mayor duración de los tratamientos. En el caso de la *Leishmania spp.* esta estrategia no ha hecho más que acentuar el problema existente ya que su tratamiento, al basarse en agentes quimioterápicos, genera mucha toxicidad y, por ende, muchos efectos adversos. Además, este manejo ha provocado la proliferación de resistencias con lo que, a lo largo del tiempo, el tratamiento de elección, es decir, los antimoniales pentavalentes, han sido desplazados por otros agentes terapéuticos que no han sido expresamente diseñados para este fin, todo ello debido a la falta de inversión por parte de la industria farmacéutica. Del mismo modo, estos agentes siguen siendo potencialmente tóxicos con lo que es necesario encontrar alternativas viables. En el caso de la listeriosis, el creciente aumento de los brotes epidémicos, la necesidad de actuar rápido ante una forma invasiva por su alta mortalidad y algunos fallos descritos con el tratamiento de elección hacen que sea necesario encontrar una forma en la que su tratamiento de elección, la ampicilina, mejore su eficacia o el empleo de nuevas moléculas antimicrobianas.

La falta de agentes terapéuticos efectivos plantea la necesidad de emplear otras tácticas. De esta manera, el diseño de nanosistemas abre un nuevo campo para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Los nanosistemas no sólo vehiculizan los agentes terapéuticos a una diana específica, sino que también permiten disminuir la

dosis y la duración del tiempo mermando la aparición de efectos adversos y disminuyendo el coste de los tratamientos.

A pesar de todas estas ventajas, aun es necesario proseguir en el estudio y diseño de los diferentes nanosistemas no solo para poder hacer frente a la falta de desarrollo de nuevos agentes terapéuticos sino para mejorar también el perfil de seguridad de estos. Los desafíos que presentan son diversos, sin embargo, la alianza de diferentes ramas en el campo de la ciencia sin duda pondrá a los nanosistemas en la vanguardia de los tratamientos para afrontar los futuros desafíos en un mundo donde las resistencias siguen aumentando problemáticamente.

Bibliografía

1. Eloit M, Graziano da Silva J, Chan M. Bacterias multirresistentes: por qué es necesaria una acción inmediata. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antibióticos. 2018.
3. Antibióticos. Gaceta Médica. 2020.
4. Aparicio P, Rodríguez E, Gárate T, Molina R, Soto A, Alvar J. Terapéutica antiparasitaria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003;21(10):579–94.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Leishmaniasis. 2020
6. De Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2015;16(2):99–109.
7. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19(1):111–26.
8. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 infections linked to ready-to-eat meat products. 2019.
9. Oteo Jesús, Alós JI. *Listeria* y listeriosis. Control de Calidad - Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 1997.
10. Organización Mundial de la Salud (OMS). Listeriosis - España. Brotes epidémicos. 2019.
11. Fleta Zaragozano J, Rodríguez Martínez G, Clavel Parrilla A. Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos | *Medicina Integral. Med. Integr.* 2001;38(6):264–9.
12. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 2007;7(9):581–96.
13. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. *F1000Res.* 2017; 6:750.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Division of Parasitic Diseases (DPDx) - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Leishmaniasis. 2017.
15. Martínez E, Giménez E, Allende I, Manzur JC, Ferreira E, Torales M, et al. Manual Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis en el Paraguay. Asunción: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social; 2011.
16. Cañeda-Guzmán IC, Zamora-Chimal J, Fernández-Figueroa EA, Soto-Serna LE, Coria-Paredes DM, Becker I. Leishmaniasis. 2018.

17. Al-Jawabreh A, Dumaidi K, Ereqat S, Al-Jawabreh H, Nasereddin A, Azmi K, et al. Molecular epidemiology of human cutaneous leishmaniasis in Jericho and its vicinity in Palestine from 1994 to 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 50:95–101.
18. Del Rosal Rabes T, Baquero-Artigao F, Gómez Fernández C, García Miguel MJ, de Lucas Laguna R. Tratamiento de la leishmaniasis cutánea con anfotericina B liposomal. *An. Pediatr.* 2010;73(2):101–2.
19. Valero NNH, Uriarte M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitol. Res.* 2020;119(2):365–84.
20. Eichenberger A, Buechi AE, Neumayr A, Hatz C, Rauch A, Huguenot M, et al. A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infect. Dis.* 2017;17(1).
21. World Health Organization (WHO). Clinical forms of the leishmaniasis. 2016.
22. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, el Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 2003;3(2):87–98.
23. World Health Organization (OMS). Leishmaniasis and HIV coinfection. 2016.
24. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; 354:1191–9.
25. No JH. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 2016; 155:113–23.
26. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Leishmaniasis - Resources for Health Professionals. 2018.
27. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2017;11(12): e0006052.
28. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Glucantime.
29. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sodium stibogluconate.
30. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev. Esp. Quimioter.* 2010;23(4):169–76.
31. Botero Aguirre JP, Restrepo Hamid AM. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: Effects on kidney function. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015;(11): CD010481.
32. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Fungizone.

33. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Miltefosine. LiverTox. 2012.
34. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 2002;347(22):1739–46.
35. Lauletta Lindoso JÁ, Lopes Costa JM, Queiroz IT, Goto H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.* 2012;3:69-77.
36. Akbari M, Oryan A, Hatam G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Trop.* 2017;172:86–90.
37. Soto J, Berman J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006;100S, S34—S40
38. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *IJVR.* 2015;16(1):1–19.
39. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Miltefosine.
40. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: An update of current pharmacotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* 2013;14(1):53–63.
41. Shalev-Benami M, Zhang Y, Rozenberg H, Nobe Y, Taoka M, Matzov D, et al. Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin. *Nat. Commun.* 2017;8(1):1–9.
42. Boelaert M, Sundar S. Leishmaniasis. En: Farrar J, director. *Manson's Tropical Diseases.* 23^a Ed. Elsevier Ltd. 2013; 631–51.
43. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Paromomycin.
44. Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, da Silva RM, Guerra JA de O, Ferreira LC de L, et al. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol.* 2011;86(6):1092–101.
45. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Pentamidine.
46. Khalil EAG, el Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: A randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet.* 2000;356(9241):1565–9.
47. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). A Phase 1 Clinical Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Vaccine Candidates LEISH-F3 + GLA-SE, LEISH-F3 + MPL-SE, and LEISH-F3 + SE in Healthy Adult Subjects. 2012.
48. Centro Nacional de Epidemiología - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018. 2019.

49. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Rev. Chil. Infectol.* 2013 May;30(4):407–16.
50. Molero García JM, Arranz Izquierdo J, Gutiérrez Pérez MI. Listeriosis: Todo lo que hay que saber. *Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC).* 2019.
51. Aoukhiyad L, Mora B, Munuera S. coordinadoras. Protocolo de actuación ante la sospecha de casos de listeriosis asociados a un brote. Illes Balears: Servei de Salut. 2019.
52. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Ampicillin.
53. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Gentamicin.
54. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014;43(6):485–96.
55. Meléndez Anzures FE, Chávez Guerrero L. Nanobiomateriales. *Ingenierías.* 2016; 19(70):55–68.
56. C. Lee Ventola M. The Nanomedicine Revolution, Part 1: Emerging Concepts. *P&T.* 2012;37(9):512–25.
57. Santa CF, López Osorio BL. Materiales poliméricos en Nanomedicina: Transporte y liberación controlada de fármacos. *Rev. acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. nat.* 2013;37(142):115-24.
58. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges. *Curr. Nanosci.* 2005;1(1):47–64.
59. Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón K, González-Méndez I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. quím.* 2016;27(4):286–91.
60. Borborema SET, Osso JA, de Andrade HF, do Nascimento N. Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: Physicochemical evaluation and antileishmanial activity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016;49(2):196–203.
61. Food and Drug Administration (FDA). Drug Approval Package: Ambisome (Amphotericin B). 1998.
62. Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* 2010;2(2):167-76
63. Vidal Vademecum. Ambisome. 2016.
64. Shadab M, Jha B, Asad M, Deepthi M, Kamran M, Ali N. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLOS ONE.* 2017;12(2):e0171306.

65. Bakker-Woudenberg IAJM, Lokerse AF, Roerdink FH, Regts D, Michel MF. Free Versus Liposome-Entrapped Ampicillin in Treatment of Infection Due to *Listeria monocytogenes* in Normal and Atbymic (Nude) Mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1985;151(5):917–24.
66. Bakker-Woudenberg IAJM, Lokerse AF, Roerdink FH. Effect of lipid composition on activity of liposome-entrapped ampicillin against intracellular *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1988;32(10):1560–4.
67. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int. J. Pharm.* 2010;387(1–2):187–98.
68. Bueno López D. Liposomas, ¿la medicina del futuro?. NAUKAS. 2014.
69. Suñé-Pou M, Suñé-Negre JM. Estrategias para la vectorización de fármacos mediante nanotecnología. *Farm. Hosp.* 2016;208:4–9.
70. Want MY, Islamuddin M, Chouhan G, Ozbak HA, Hemeg HA, Dasgupta AK, et al. Therapeutic efficacy of artemisinin-loaded nanoparticles in experimental visceral leishmaniasis. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015;130:215–21.
71. Abamor ES. Antileishmanial activities of caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles against *Leishmania infantum* promastigotes and amastigotes in vitro. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2017;10(1):25–34.
72. Youssef M, Fattal E, Alonso MJ, Roblot-Treupel L, Sauzieres J, Tancrede C, et al. Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988;32(8):1204–7.
73. Gao Z, Yang D, Wan Y, Yang Y. One-step synthesis of carbon dots for selective bacterial inactivation and bacterial differentiation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020;412(4):871–80.
74. Das S, Devarajan P v. Enhancing safety and efficacy by altering the toxic aggregated state of Amphotericin B in lipidic nanoformulations. *Mol. Pharm.* 2020.
75. Trinetta V, Morgan MT, Coupland JN, Yucel U. Essential Oils Against Pathogen and Spoilage Microorganisms of Fruit Juices: Use of Versatile Antimicrobial Delivery Systems. *J. Food Sci.* 2017;82(2):471–6.
76. Bayón-Cordero L, Alkorta I, Arana L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. *Nanomaterials (Basel).* 2019;9(3):474.
77. Jain K, Verma AK, Mishra PR, Jain NK. Characterization and evaluation of amphotericin B loaded MDP conjugated poly (propylene imine) dendrimers. *Nanomedicine.* 2015;11(3):705–13.
78. Llinàs MC, Sánchez-García D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *Afinidad.* 2014;71(565):20–31.

79. Duraisamy S, Balakrishnan S, Jayachandran J, Husain F, Kumarasamy A. Effect of *Bacillus cereus* peptide conjugated with nanoporous silica on inactivation of *Listeria monocytogenes* in apple juice, as an ecofriendly preservative. *Environ. Sci. Pollut. R.* 2018;25(29):29345–55.
80. Davis JJ, Huang WY, Davies GL. Location-tuned relaxivity in Gd-doped mesoporous silica nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 2012;22(43):22848–50
81. Jebali A, Kazemi B. Nano-based antileishmanial agents: A toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. *Toxicol. In Vitro.* 2013;27(6):1896–904.
82. Ahmadi FS, Tanhaeian A, Pirkohi MH. Biosynthesis of silver nanoparticles using *chlamydomonas reinhardtii* and its inhibitory effect on growth and virulence of *listeria monocytogenes*. *Iran. J. Biotechnol.* 2016;14(3):103–8.

Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias tanto a mi Directora de TFG como a mi Co-Directora por toda la ayuda y consejos que me han dado para preparar este trabajo de fin de grado.

A mis padres, a mi Bimba y el resto de mi familia que me han brindado su apoyo y amor infinito incluso en las noches más largas. Gracias por hacer que estos años, y en especial este último con todas las cosas que han pasado, hayan sido más llevaderos y haya valido la pena.

Por último, mencionar a mis amigas Ana, Irene y Raquel con las que obviamente esta etapa no habría sido lo mismo.